

Untersuchung der Fluoreszenz- und Elektronentransfereigenschaften von Phenanthridinium- Derivaten in DNA

Zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät IV - Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg



DISSERTATION

von

Diplom-Chemikerin

Christa Prunkl

aus Landshut

Regensburg, 2009

Diese Arbeit wurde angeleitet durch Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht

Prüfungsgesuch eingereicht am: 23. Dezember 2009

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Januar 2010

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Joachim Wegener (Vorsitzender)
	Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht
	Prof. Dr. Burkhard König
	Prof. Dr. Bernhard Dick

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2006 bis Dezember 2009 am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg unter Anleitung durch Herrn Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht angefertigt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Achim Wagenknecht danke ich sehr herzlich für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, sowie die wissenschaftlich interessante Themenstellung und die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Im Speziellen bedanke ich mich bei:

- meinen Kollegen Janez Barbaric, Daniela Baumstark, Sina Berndl, Christoph Beyer, Ulrike Bruckner, Thomas Ehrenschwender, Nadine Herzig, Carolin Holzhauser, Praveen Kumar, Daniel Lachmann, Florian Menacher, Alexander Penner, Veronika Rödl, Moritz Rubner, Wolfgang Schmucker, Sabrina Sezi, Dr. Linda Valis, Dr. Reji Varghese, Dr. Clemens Wagner, Dr. Claudia Wanninger-Weiß, und Michael Weinberger für die gute Zusammenarbeit und die lockere Arbeitsatmosphäre.
- meinen Laborkollegen Caro, Claudia, Clemens, Moritz, Nadine und Tom für die fröhliche Laboratmosphäre und den Spaß, den wir zusammen im Labor hatten.
- Dr. Thomas Burgemeister und seinen Mitarbeitern der NMR-Abteilung für die Messung und Interpretation der NMR-Spektren.
- Dr. Rudolf Vasold und Ernst Lautenschlager für die Aufreinigung meiner Endprodukte mittels RP-HPLC.
- Dr. Manfred Zabel für die Kristallstrukturmessungen.
- Josef Kiermeier und Wolfgang Söllner für die Anfertigung und Interpretation der Massenspektren.
- Helmut Schüller und seinen Mitarbeiterinnen für die Durchführung der Elementaranalysen.
- Prof. Dr. Wolfgang Rettig und Dr. Vladimir Kharlanov von der Humboldt Universität Berlin für die quantenmechanischen Berechnungen.
- Markus Pichlmaier vom AK Winter für die Unterstützung bei den CV-Messungen.
- Roger Kutta vom AK Dick für die Hilfe bei physikalischen Problemstellungen.
- Stefan Nagel und Matthias Stich vom AK Wolfbeis für die Hilfestellung bei der Messung der Fluoreszenzlebenszeiten.
- all meinen Praktikanten, Lehramts- und Bachelorstudenten für ihren Arbeitseinsatz und ihr Engagement.

- unserer Sekretärin Ulrike Weck für ihre Hilfsbereitschaft und die Unterstützung in organisatorischen Belangen.

Darüber hinaus möchte ich v. a. bei meiner Familie bedanken. Ohne den Rückhalt und die Unterstützung durch meine Eltern wären mein Studium und die Promotion nicht möglich gewesen. Auch meiner Schwester möchte ich herzlich danken, die immer für mich da ist und mir mit Rat und Tat zur Seite steht.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Hannes, der mein Fels in der Brandung ist und mich immer wieder zum Lachen bringt.

Einige Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Photoinduced short-range electron transfer in DNA with fluorescent DNA bases: lessons from ethidium and thiazole orange as charge donors, C. Prunkl, S. Berndl, C. Wanninger-Weiß, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2010**, 12, 32-44

Optical, redox and DNA-binding properties of phenanthridinium chromophores: elucidating the role of the phenyl substituent for the fluorescence enhancement of ethidium in presence of DNA, C. Prunkl, M. Pichlmaier, R. Winter, V. Kharlanov, W. Rettig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.*, angenommen

Inhaltsverzeichnis

1. Motivation.....	1
2. Themenstellung.....	3
3. Theoretischer Hintergrund	7
3.1. Möglichkeiten der Wechselwirkung mit DNA	7
3.2. Spektroskopische Methoden: UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie	9
3.2.1. Einfluss äußerer Bedingungen auf Absorption und Emission.....	9
3.2.2. Reaktionen im angeregten Zustand: Vorstellung des TICT-Konzepts.....	14
3.2.3. Bestimmung der Bindungskonstanten: Theorie von McGhee und von Hippel....	18
3.2.4. Berechnung der Fluoreszenzlebenszeiten nach <i>Strickler</i> und <i>Berg</i> und Bestimmung der <i>Arrhenius</i> -Parameter	21
3.3. Ladungstransfer in DNA	24
3.3.1. Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden	25
3.3.2. Oxidativer Ladungstransfer	28
3.3.3. Reduktiver Elektronentransfer	33
3.4. Biologische Relevanz von Ladungstransferreaktionen in DNA	37
3.5. Ethidium als biochemische Sonde für Ladungstransferreaktionen	40
3.6. DNA-Festphasensynthese und postsynthetische Modifikation von DNA-Strängen....	45
3.7. Detektion von Punktmutationen und das DETEQ-Konzept.....	47
4. Phenanthridinium-Chromophore	53
4.1. Hintergrund zu Farbstoffen mit Phenanthridinium-Grundgerüst.....	53
4.2. Darstellung der Phenanthridinium-Chromophore	56
4.2.1. Synthese von 5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (1) und 5-Ethyl- 6-phenyl-phenanthridiniumiodid (2)	56

4.2.2. Synthese von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-methyl-phenanthridinium-trifluoracetat (3) und 3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4- <i>N,N</i> -diethylamino)-phenyl-phenanthridiniumtrifluoracetat (4)	57
4.3. Spektroskopische Charakterisierung von Ethidium und 1-4	62
4.3.1. Spektroskopisches Verhalten in wässrigen Lösungen.....	63
4.3.2. Solvatochromie von Ethidium und 1-4	67
4.4. Elektrochemische Charakterisierung von Ethidium und 1-4	76
4.5. Titrationsexperimente der Farbstoffe Ethidium und 1-4 mit DNA	78
4.5.1. Spektrophotometrische Titrationsen und Bestimmung der Bindungsparameter ...	79
4.5.2. Spektrofluorimetrische Titrationsen	83
4.6. Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Viskositätsabhängigkeit.....	87
4.6.1. Messungen in reinem Glycerin bei verschiedenen Temperaturen	87
4.6.2. Messungen in verschiedenen Glycerin-Wasser-Mischungen.....	89
4.6.3. Bestimmung der Arrhenius Parameter	92
4.7. Quantenmechanische Berechnungen.....	100
4.8. Zusammenfassung	106
5. Ethidium als Elektronendonator für Ladungstransferprozesse in Oligonukleotiden.....	109
5.1. Untersuchungen eines DETEQ-Systems aus Ethidium und 5-Nitroindol.....	109
5.1.1. Ethidium als artifizielle DNA-Base	111
5.1.2. Studien zum reduktiven Ladungstransfer mit Ethidium als Elektronendonator und 5-Nitroindol als Akzeptor.....	112
5.1.3. Anwendung des DETEQ-Konzepts im Donor-Akzeptor-Paar Ethidium-Nitroindol	122
5.2. Methylviologen als nukleosidischer Elektronenakzeptor.....	127
5.2.1. Hintergrundinformationen zu Methylviologen	127
5.2.2. Synthese des azidmodifizierten Methylviologen-Derivats 42 und spektroelektrochemische Charakterisierung von 41	130

5.2.3. Synthese und spektroskopische Untersuchungen der Eigenschaften methylviologenmodifizierter Duplexe	133
5.2.4. Vergleich des reduktiven Ladungstransfers im Donor-Akzeptor-Paar Ethidium- Methylviologen mit Ethidium-Nitroindol	141
5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	145
6. Zusammenfassung.....	147
7. Experimenteller Teil	151
7.1. Materialien und Geräte.....	151
7.2. Synthesen.....	156
7.2.1. Darstellung von 5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (1).....	156
7.2.2. Darstellung von 5-Ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumiodid (2)	160
7.2.3. Darstellung von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-methyl-phenanthridinium- trifluoracetat (3).....	162
7.2.4. Darstellung von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4- <i>N,N</i> -diethylamino)-phenyl- phenanthridiniumtrifluoracetat (4)	169
7.2.5. Darstellung des acyclischen Aminopropandiol-Linkers (31).....	177
7.2.6. Darstellung des Ethidiumnukleosids (38)	179
7.2.7. Darstellung von <i>N</i> -(3-Azidopropyl)- <i>N'</i> -methyl-4,4'-bipyridiniumiodid (42)....	185
7.2.8. Darstellung des alkynylmodifizierten Uridins (49).....	188
7.3. Charakterisierung von Ethidium und 1-4	194
7.3.1. Untersuchung der photophysikalischen Eigenschaften	194
7.3.2. Untersuchung des Bindungsverhaltens an DNA	197
7.3.3. Viskositätsabhängigkeit von Absorption und Fluoreszenz	198
7.3.4. Fluoreszenzlebenszeiten nach <i>Strickler-Berg</i>	200
7.4. Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden.....	205
7.4.1. Verwendete Oligonukleotidsequenzen.....	205
7.4.2. Kupplungsprotokolle	210

7.4.3. Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide	213
7.4.4. Klickreaktion	214
7.4.5. Charakterisierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden	215
7.4.6. Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide	217
7.5. Quantenmechanische Berechnungen.....	223
7.6. Daten zur Kristallstruktur	223
7.6.1. Kristallstruktur von 5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (1)	223
7.6.2. Kristallstruktur von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4- <i>N,N</i> -diethylamino)-phenyl- phenanthridiniumtrifluoracetat (4)	226
8. Literaturverzeichnis	231

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
8-oxo-dG	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
Å	Angström
A	Absorption; Adenin, 2'-Desoxyadenosin
abs.	absolut
Ak	Akzeptor
Alloc	Allyloxycarbonyl
AN	Akzeptornummer
Arg	Arginin
a. u.	<i>arbitrary units</i>
BEMP	2- <i>tert</i> -Butylimino-2-diethylamino-1,3-dimethylperhydro-1,3,2-Diazaphosphorin
Bp	Basenpaar
brs	breites Singulett
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin, 2'-Desoxycytidin
ca.	circa
CD	Zirkulardichroismus
CI	chemische Ionisation
CPG	<i>Controlled Pore Glass</i>
CT	Ladungstransfer (<i>charge transfer</i>)
CV	Cyclovoltammetrie
δ	chemische Verschiebung
d	Dublett, Tag
DC	Dünnschicht-Chromatographie
dd	Dublett von Dubletts
DETEQ	<i>Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching</i>
d. h.	das heißt
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl

DN	Donornummer
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Do	Donor
dU	2'-Desoxyuridin
E ₀₀	Singulett-Energie des HOMO-LUMO-Übergangs
E	Ethidiumbromid
EA	Elementaranalyse
EI	elektrische Ionisation
Em	Emission
E _{ox}	Oxidationspotential
E _{ox} [*]	Oxidationspotential des angeregten Zustands
eq.	Äquivalent
E _{red}	Reduktionspotential
E _{red} [*]	Reduktionspotential des angeregten Zustands
ESI	Elektrosprayionisation
ESR	Elektronenspinresonanz
ET	Elektronentransfer
Et	Ethidium
E _T 30	Parameter der Lösungsmittelpolarität
et al.	<i>et alii</i>
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
Ex	Anregung (<i>excitation</i>)
F	Fluoreszenz
Δf	Orientierungspolarisation
FAB	<i>fast atom bombardment</i>
FC	<i>Flash</i> -Säulenchromatographie
FRET	Fluoreszenzresonanz-Energietransfer
G	Guanin, 2'-Desoxyguanosin
G ^{ox}	Oxidationsprodukte von G
h	Stunde
HOMO	<i>highest occupied molecular orbital</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HV	Hochvakuum

Hz	Hertz
I	Intensität
IC	<i>Internal conversion</i>
ISC	<i>Intersystem crossing</i>
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K	Kelvin
LM	Lösungsmittel; Laufmittel
LUMO	<i>lowest unoccupied molecular orbital</i>
M	molar, mol/L
m	Multiplett
mbar	Millibar
m/z	Verhältnis Masse zu Ladung
mdeg	<i>millidegree</i>
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Flugzeit-Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
min.	Minute
mM	millimolar
μM	mikromolar
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MV	Methylviologen
Ni	5-Nitroindol
Na-P _i	Natriumphosphatpuffer
nm	Nanometer
NMR	Kernspinmagnetresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NHE	Normalwasserstoff-Elektrode
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pom	Pivaloylmethyl
ppm	<i>parts per million</i>
ps	Pikosekunde

Py	Pyren(yl)
PydG	8-(1-Pyrenyl)-2'-desoxyguanosin
Pyin	1-Ethynylpyrenyl-
PtzdU	5-(10-Methyl-phenothiazim-3-yl)-2'-desoxyuridin
q	Quartett
R _f	Retentionsfaktor
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
S	Singulett-Zustand
s	Singulett; Sekunde
Ser	Serin
SNP	Einzelbasen-Punktmutation (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
sog.	sogenannt
ss	Einzelstrang
T	Thymin, 2'-Desoxythymidin
T	Triplett-Zustand
t	Triplett
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
TBAHS	Tetrabutylammoniumhydrogensulfat
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
U	Uracil
u. a.	unter anderem
UV/Vis	Ultraviolettes und sichtbares Spektrum (190 - 800 nm)
V	Volt; Methylviologen (<i>N,N</i> -Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid)
v. a.	vor allem
Zg	7-Deazaguanin
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

Die in dieser Arbeit verwendete Nomenklatur orientiert sich an den *Chemical Abstracts*¹ und an den von der *IUPAC-IUB-Kommission*² empfohlenen Richtlinien. Fachausdrücke aus dem Englischen sind kursiv gedruckt.

¹ *Chemical Abstracts*, Index Guide, 77.

² a) *IUPAC Commission on Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC)* und *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN)*, *Biochemistry* **1971**, 10, 3983-4004.

b) *IUPAC-IUB (CBN)*; Tentative Rules for Carbohydrate Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1971**, 21, 455-477

1. Motivation

Der größte Traum von Medizinern ist seit jeher die Bekämpfung und Heilung von Krankheiten, insbesondere derer, die im Allgemeinen als unheilbar gelten, wie z. B. Autoimmunkrankheiten oder aggressive Krebserkrankungen. Ein kürzlich in *Science* veröffentlichter Artikel berichtet von einem vielversprechenden Schritt in diese Richtung.^[1] Ein internationales Forscherteam schildert darin die erfolgreiche gentherapeutische Behandlung zweier 7-jähriger Jungen, die mit der tödlich verlaufenden Nervenkrankheit ALD (*Adrenoleukodystrophie*) - bekannt aus dem Film „Lorenzos Öl“ (1992) - geboren wurden.^[2] Den Forschern gelang es, den Gendefekt in den Stammzellen mittels inaktivierter Viren aus der HIV-Familie zu reparieren und so den Abbau von Myelin, der fettartigen „Isoliersubstanz“ im Gehirn, zu stoppen.

Den Grundstein der modernen Molekularbiologie, und damit die Voraussetzung für neuartige Therapieansätze, legte der Arzt *Friedrich Miescher* im Jahre 1871. Ihm gelang es erstmals Desoxyribonukleinsäure (DNA) aus Zellen zu isolieren.^[3] Die Tragweite dieser bedeutenden Entdeckung wurde allerdings erst mehr als 70 Jahre später von *Oswald Avery* erkannt, der die DNA als Träger der Erbinformation identifizierte.^[4] Mit der Aufklärung der doppelhelikalen Struktur der DNA durch *James Watson* und *Francis Crick* im Jahre 1953 begann schließlich das Zeitalter der modernen Molekularbiologie.^[5] Zusammen mit *Maurice Wilkins* erhielten sie dafür 1962 den Chemie-Nobelpreis.^[3] Den vorläufigen Höhepunkt erreichte man im Jahre 2003 mit der Vollendung des *Humanen Genom Projekts*.^[6] Inzwischen wurden leistungsfähige Verfahren zur Analyse^[7] und Herstellung^[8-10] von DNA-Sequenzen sowie zur Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR),^[11] für deren Entdeckung *Kary Mullis* im Jahre 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde,^[3] entwickelt.

Im Rahmen des *Humanen Genom Projekts* wurde festgestellt, dass im menschlichen Genom, welches ca. 3 Mrd. Basenpaare umfasst,^[12] häufig sog. Einzelbasenpunktmutationen (SNP, *single nucleotide polymorphism*) auftreten.^[13] Die beiden Kopien des menschlichen Genoms, die Chromosomen, unterscheiden sich in ca. 0,1 % der Nukleotide. Das bedeutet, dass im Durchschnitt eine Punktmutation pro 1000 Basen auftritt.^[14-16] Befinden sich diese SNPs in codierenden Regionen der Gene, so können dadurch Translation und Transkription beeinflusst werden, was erblich bedingte Krankheiten oder Erkrankungen wie z. B. Krebs, Alzheimer oder Parkinson zur Folge haben kann.^[17] Die Detektion von Mutationen, insbesondere von SNPs, ist dabei von fundamentaler Bedeutung, da nur bei Kenntnis der individuellen

genetischen Voraussetzungen ein Ausbruch dieser Krankheiten frühzeitig erkannt, verzögert oder gar verhindert werden kann. Mittlerweile ist es auch möglich, Infektionskrankheiten durch Analyse der DNA des Krankheitserregers frühzeitig und zweifelsfrei zu erkennen und gezielt zu behandeln.^[18] Außerdem geht man davon aus, dass die individuell unterschiedliche Wirksamkeit bestimmter Arzneimittel genetisch bedingt ist, wodurch die Detektion von SNPs auch für die Pharmakogenomik, deren Ziel eine individuelle, für jeden Patienten maßgeschneiderte Therapie darstellt (*personalized healthcare*), von großem Interesse ist.^[19, 20] Es gibt bereits eine Reihe enzymatischer und nicht-enzymatischer Methoden zum Nachweis von SNPs,^[21, 22] von denen sich bislang allerdings keine richtig durchsetzen konnte, was u. a. mit der erheblichen Anzahl an Arbeitsschritten und den damit verbundenen Kosten zusammenhängt. Zur automatisierten Analyse von DNA-Sequenzen werden häufig sog. DNA-Arrays oder DNA-Chips verwendet.^[23] Der Nachweis von SNPs beruht dabei auf der Fähigkeit der DNA, Ladungen entlang des Basenstapels zu transportieren, wobei die Effizienz der Ladungstransferprozesse stark von einer korrekten Basenpaarung abhängt.^[24] Trotz des beachtlichen Fortschritts im Bereich der SNP-Detektion ist es weiterhin notwendig Grundlagenforschung auf diesem Gebiet zu betreiben, um bestehende Systeme zu verbessern und neue Assays zu entwickeln, die einen einfachen, zuverlässigen, effizienten und kostengünstigen Nachweis von SNPs gewährleisten. Das Erkennen einer genetischen Variation und der Auswirkungen, die diese mit sich bringt, sind Wegbereiter für die Entwicklung neuer Diagnose- und Therapieansätze, welche eine erfolgreiche Behandlung bisher unheilbarer Krankheiten, wie die eingangs erwähnte Nervenkrankheit ALD, möglich machen können.

2. Themenstellung

Ethidiumbromid (**E**) wird aufgrund seines starken Fluoreszenzanstiegs bei Interkalation in DNA seit Jahrzehnten zum Anfärben von Oligonukleotiden nach der Gelelektrophorese verwendet.^[25, 26] Trotz intensiver Bemühungen ist die Ursache dieser Intensitätserhöhung noch nicht komplett verstanden und kann mit keinem der bisher existierenden Modelle (vgl. Kapitel 3.5) vollständig beschrieben werden. Zur Optimierung der Farbstoffeigenschaften ist die Kenntnis mechanistischer Details jedoch sehr wichtig. Daher beschäftigt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Herstellung und Charakterisierung der Phenanthridinium-Farbstoffe **1-4**, die sich durch verschiedene Substituenten an den Positionen 3, 6 und 8 am Phenanthridinium-Grundgerüst von Ethidiumbromid unterscheiden.

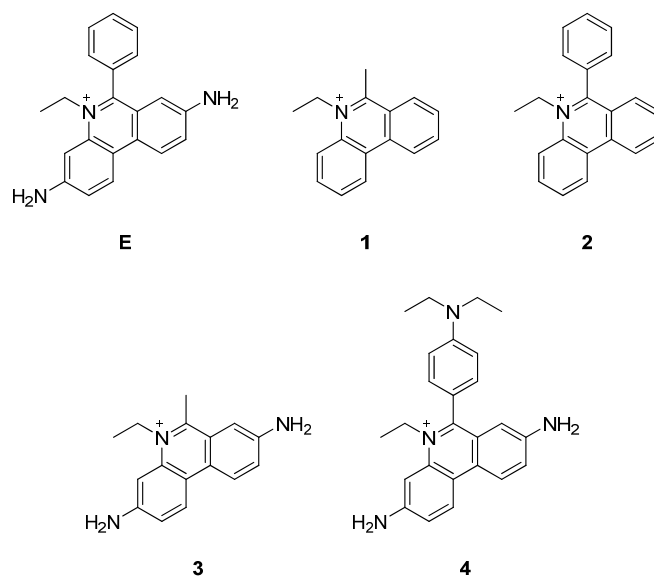


Abb. 2-1: Ethidiumbromid (**E**) und die Zielmoleküle **1-4**.

Die Ergebnisse der spektrophotometrischen, spektrofluorimetrischen und elektrochemischen Untersuchungen sollen mit denen von Ethidiumbromid als Referenzsubstanz verglichen werden um neue Erkenntnisse bezüglich des Einflusses der Substituenten auf die Fluoreszenz- und DNA-Bindungseigenschaften von Ethidiumbromid zu erhalten. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe *Rettig* sollen anschließend die auf den experimentellen Daten basierenden Hypothesen bezüglich der Gründe des Fluoreszenzverhaltens der Verbindungen durch quantenmechanische Rechnungen bestätigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wird das Ziel verfolgt, reduktiven Ladungstransfer durch den Basenstapel zur Detektion von Punktmutationen zu nutzen. In der Arbeitsgruppe

Wagenknecht wurde dazu das DETEQ-Konzept (*Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching*) entwickelt, das eine Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen, basierend auf oxidativem Lochtransfer zwischen einem Ethidiumbasensurrogat (**Et**) und 7-Deazaguanin (**Zg**), über eine Distanz von zwei Basenpaaren ermöglicht.^[27-29] Ein generelles Ziel dieser Forschung ist die Vergrößerung der Reichweite, um Punktmutationen innerhalb eines ganzen Codons (bestehend aus drei Basenpaaren) detektieren zu können. Außerdem muss die praktische Anwendbarkeit dahingehend verbessert werden, dass der Ladungsakzeptor keinerlei Präferenzen für die Gegenbase aufweist (7-Deazaguanin paart bevorzugt mit C).

In Vorarbeiten von *Valis* wurde gezeigt, dass reduktiver Elektronentransfer zwischen dem Ethidiumbasensurrogat (**Et**) und der universellen Base 5-Nitroindol (**Ni**) mit $\Delta G \approx -0,2$ eV eine ähnliche Triebkraft sowie ähnliche Abstandsabhängigkeiten und Ladungstransferraten aufweist wie der oxidative Elektronentransfer zwischen Ethidium und 7-Deazaguanin, wenn in beiden Fällen ein *dSpacer*, das chemisch stabile Analogon einer abasischen Stelle, gegenüber des Ethidiumbasensurrogats positioniert ist.^[30] Da sich in der Ziel-DNA eines Assays gewöhnlich eine der natürlichen Basen gegenüber von Ethidium befindet, sollen zunächst die Ladungstransfereigenschaften des Systems exemplarisch mit C als Gegenbase untersucht werden. Im nächsten Schritt soll die Anwendbarkeit des DETEQ-Konzepts zur Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen für das System Ethidium-Nitroindol untersucht werden.

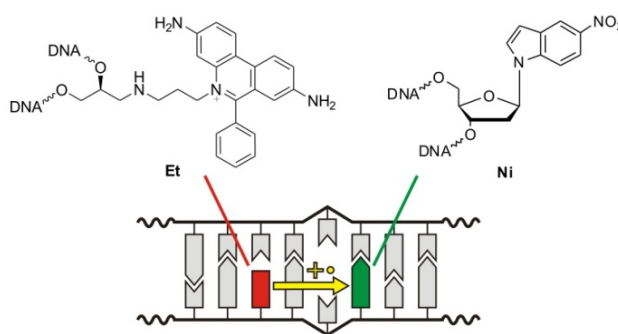


Abb. 2-2: Geplante Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen entsprechend dem DETEQ-Konzept mit einem Ethidiumbasensurrogat (**Et**) als Ladungsdonor und 5-Nitroindol (**Ni**) als Ladungsakzeptor.

Darüber hinaus soll ein Methylviologen-Derivat (**MV**) als alternativer Elektronenakzeptor hergestellt und mittels kupferkatalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) post-synthetisch an DNA gebunden werden. Das Reduktionspotential von **MV** ist vergleichbar mit dem von 5-Nitroindol.^[31] Das reduzierte radikalische Methylviologenmonokation zeigt eine typische blaue Farbe ($\lambda_{\text{max}} = 603$ nm),^[32] was eine Detektion des Ladungstransfers mittels

transienter Absorption zusätzlich zur Löschung der Fluoreszenz prinzipiell ermöglichen sollte. Nach der spektroskopischen Charakterisierung der methylviologenmodifizierten Duplexe sollen die Ladungstransfereigenschaften im System Ethidium-Methylviologen untersucht werden.

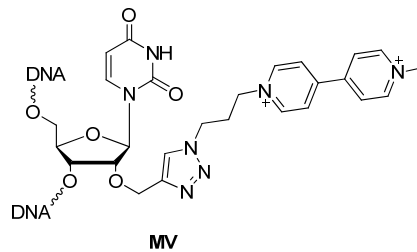


Abb. 2-3: Zielmolekül: Methylviologen (**MV**) kovalent an DNA gebunden.

3. Theoretischer Hintergrund

3.1. Möglichkeiten der Wechselwirkung mit DNA

Frühe Untersuchungen zeigten bereits, dass unterschiedliche Reagenzien, wie Cyanin-Farbstoffe,^[33] verschiedene Antibiotika^[34] und Acridine,^[35] starke Wechselwirkungen mit der DNA eingehen können, wenngleich anfangs noch unklar war, wie diese Assoziate aussehen sollten. Die Struktur der DNA und ihre Zusammensetzung bieten mehrere Möglichkeiten der supramolekularen Wechselwirkung. Polare und geladene Gruppen ermöglichen eine Vielzahl von Wasserstoffbrücken-Bindungen und elektrostatischer Anziehung, die auch dem Strang selbst seine Stabilität und charakteristische Form geben. Die aromatischen Bestandteile der Basenpaare erlauben π - π -Wechselwirkungen. Die Bindung an DNA lässt sich im Allgemeinen in drei Hauptarten unterteilen:^[36-38]

- Externe Bindung am Phosphat-Rückgrat
- Bindung in kleiner oder großer Furche
- Interkalation

Die erstgenannte externe Bindung ist ausschließlich auf elektrostatische Wechselwirkungen zwischen einer positiv geladenen Verbindung und dem negativ geladenen Phosphat-Rückgrat der DNA zurück zu führen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der Furchenbindung und der Interkalation um supramolekulare Komplexe aus DNA und Gastmolekül, die durch π - π -Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen, *van-der-Waals*-Kräften oder hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert werden.^[38]

Die beiden Furchen der DNA-Helix stellen interessante Bindungsplätze für organische Moleküle dar. Während sich viele Proteine^[39] und Substanzen wie Methylgrün^[40] (vgl. Abb 3-1) hauptsächlich in die große Furche der DNA einlagern, treten Verbindungen wie 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)^[41] und Distamycin^[42, 43] vorwiegend mit der kleinen Furche in Wechselwirkung. Furchenbinder bestehen meist aus mindestens zwei aromatischen oder heteroaromatischen Ringen, die über eine flexible Bindung miteinander verknüpft sind. Außerdem weisen sie häufig Substituenten wie Amidin- oder Guanidin-Funktionen auf, die mit den in der Furche liegenden DNA-Basen spezifische Wechselwirkungen eingehen.^[38] Die Furchenbindung findet bevorzugt in A-T-reichen Sequenzen statt, da hier das elektrostatische Potential höher ist und zudem keine sterische Hinderung durch in die Furche ragende Substituenten, wie z. B. die Aminogruppe bei Guanin,

auftritt.^[36, 38, 44] *Zimmermann* bezeichnet diese Art der Bindung als kompetitiv, da eine hohe Salzkonzentration zur Auflösung der Bindung, die hauptsächlich elektrostatischer Natur ist, führen kann.^[45, 46]

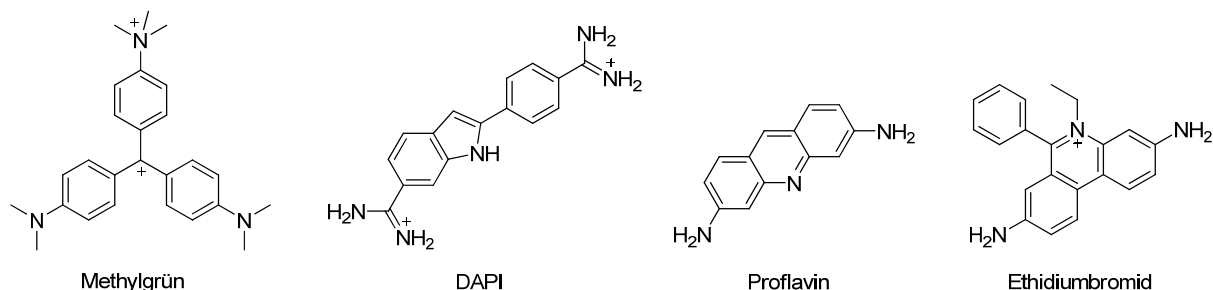


Abb. 3-1: Strukturen bekannter Furchenbinder und Interkalatoren.

Der faszinierendste der drei genannten Bindungsmodi ist wahrscheinlich die Interkalation, die dadurch charakterisiert wird, dass sich planare aromatische Systeme zwischen die Basen der DNA-Helix einlagern und starke π - π -, Dipol-Dipol- und Dispersionswechselwirkungen eingehen.^[36, 47-49] Im Jahr 1961 belegte *Lerman* erstmals die Möglichkeit der Interkalation, d. h. die Einlagerung von Stoffen in den Basenstapel der DNA.^[35] Diese Art der Wechselwirkung fand breite Zustimmung, wurde vielfältig bewiesen und die Auswirkungen auf Struktur und Funktion der DNA wurden intensiv erforscht.^[34, 50-52] Die ersten Kristallstrukturen von Interkalationskomplexen in Dinukleotiden wurden 1975 von der Arbeitsgruppe *Sobell* veröffentlicht (vgl. Kapitel 3.5).^[53-55] Kleinere aromatische Verbindungen, wie Naphthalin-Derivate, benötigen zur Interkalation zudem eine positive Ladung, die entweder im Ringsystem selbst oder in den Seitengruppen lokalisiert sein muss, während größere aromatische Systeme auch ohne zusätzliche Ladung interkalieren können.^[36, 56] Im Gegensatz zu den anderen Bindungsmodi hat die Interkalation einen signifikanten Einfluss auf die Struktur der DNA. Verschiedene Untersuchungen ergaben, dass sich die Doppelhelix durch die Interkalation pro eingelagertem Molekül um 3,4 Å verlängert und um bis zu 26° aufwindet.^[36, 39, 57] Das hat zum einen eine Verlängerung der Helix zur Folge, zum anderen bringt es eine Änderung der Konformation der Deoxyriboseeinheiten mit sich. Aus dieser Konformationsänderung der DNA resultiert wahrscheinlich eine sterische Hinderung, die dazu führt, dass nicht zwischen jedem Basenpaar ein Molekül interkalieren kann, sondern nur max. zwischen jedem zweiten.^[39, 57, 58] Diese Beobachtung hat sich als Nachbargruppenausschlussprinzip (*nearest neighbourhood exclusion principle, NNEP*) in der Literatur etabliert. *Zimmermann* beschreibt die Interkalation als nicht-kompetitive Bindung, da die

Assoziationskonstante unabhängig von der Salzkonzentration ist und der Ort der Bindung durch die umgebende DNA geschützt ist. ^[45, 46]

Da sich die physikalischen Eigenschaften des DNA-Duplexes wie auch die des Gastmoleküls bei einer Komplexbildung sehr stark ändern, ist es möglich, die Assoziation mit Hilfe verschiedener Messverfahren zu verfolgen und so den Bindungsmodus zu bestimmen. ^[36, 38]

Dazu findet man in der Literatur eine ganze Reihe verschiedener Methoden, z. B. Kalorimetrie, Viskosimetrie, Sedimentationskoeffizientenmessungen, Schmelztemperaturanalyse, NMR-Spektroskopie und Kristallstrukturanalyse. ^[37, 59-63] Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften aromatischer Farbstoffe bieten sich vor allem spektrophotometrische und spektrofluorimetrische Messungen an, da eine Komplexbildung mit DNA meist zu einer signifikanten Änderung der Absorptions- und Emissionseigenschaften des Farbstoffs führt. ^[36, 38]

3.2. Spektroskopische Methoden: UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie

Mit spektroskopischen Methoden kann man einfach und effizient die optischen und elektronischen Eigenschaften eines Systems überprüfen. In dieser Arbeit werden hauptsächlich UV/Vis- und stationäre sowie zeitaufgelöste Fluoreszenzspektroskopie zur Charakterisierung aromatischer Farbstoffe und zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen durch Oligonukleotide angewandt. Die Grundlagen der UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie sind in der Literatur ^[64, 65] ausführlich beschrieben und werden daher hier nicht explizit erläutert.

3.2.1. Einfluss äußerer Bedingungen auf Absorption und Emission

Verglichen mit der Absorption reagiert die Fluoreszenz von Molekülen im Allgemeinen deutlich empfindlicher auf Veränderungen der Umgebung, wobei verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. ^[66]

Fluoreszenzlöschung

Ein angeregter Fluorophor kann seine Energie, wie bereits erwähnt, ohne Beteiligung anderer Moleküle abgeben: entweder durch Emission eines Lichtquants (Fluoreszenz) oder in Form von strahlungslosen Relaxationsprozessen (*Internal Conversion, IC; Intersystem Crossing, ISC*). Die Energie kann allerdings auch für chemische Reaktionen genutzt oder durch Energie-

bzw. Ladungstransfer (vgl. Kapitel 5.1.2) auf Nachbarmoleküle übertragen werden. Diese Prozesse führen zu einer Verringerung bzw. Löschung der Fluoreszenz und werden daher allgemein als *Quenching* bezeichnet.

Die Löschung der Fluoreszenz durch Wechselwirkung mit einem Nachbarmolekül kann sowohl aus dem Grundzustand als auch aus dem angeregten Zustand erfolgen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen dynamischer und statischer Fluoreszenzlöschung. Bei statischer Löschung findet die Energieübertragung in einem *Quencher*-Fluorophor-Komplex statt, der sowohl im Grundzustand als auch im angeregten Zustand des Fluorophors gebildet werden kann. Dynamische Fluoreszenzlöschung ist dadurch charakterisiert, dass die Energie durch Stoßprozesse vom Fluorophor auf das *Quencher*molekül übertragen wird.

Mit Hilfe der *Stern-Vollmer*-Gleichung kann die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration des *Quenchers* Q quantifiziert werden.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k\tau_0[Q] = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{Gleichung 3-1}$$

Dazu benötigt man die integrierte Fluoreszenzintensität des Fluorophors in Abwesenheit (F_0) und in Gegenwart des *Quenchers* (F). Durch eine Auftragung von F_0/F gegen $[Q]$ erhält man aus der Steigung die *Stern-Vollmer*-Konstante K_{SV} . Ein wichtiges Unterscheidungskriterium zwischen statischer und dynamischer Löschung ist die Fluoreszenzlebenszeit, da diese im Falle dynamischer Löschung bei steigender *Quencher*konzentration reduziert wird, während sie bei statischer Löschung gleich bleibt.

Temperatur

Strahlungslose Relaxationsprozesse sind stark temperaturabhängig. Ein Absinken der Temperatur verlangsamt die strahlungslose Relaxation, wodurch der Anteil der strahlenden Relaxation und damit auch die Quantenausbeute erhöht wird.

Konzentrationseffekte

Die lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Chromophor-Konzentration gilt nur für geringe Konzentrationen (bis ca. 10^{-2} M). Bei höheren Konzentrationen steigt die Wahrscheinlichkeit einer strahlungslosen Energieübertragung von einem angeregten Molekül auf ein Molekül im Grundzustand.

Lösungsmittelleffekte

Die Intensität und Lage der Absorptions- und v. a. auch der Fluoreszenzspektren sind oft stark abhängig von der Art des verwendeten Lösungsmittels. Diese lösungsmittelabhängige Verschiebung des Absorptions- und Emissionsmaximums wird als *Solvatochromie* bezeichnet. Erfolgt die Verschiebung zu kürzeren Wellenlängen, spricht man von einer *hypsochromen* Verschiebung, während die Verschiebung zu längeren Wellenlängen *bathochrome* Verschiebung genannt wird. Eine *bathochrome* Verschiebung der Emission wird häufig bei steigender Lösungsmittelpolarität beobachtet, was an der antiparallelen Ausrichtung der Dipolmomente des Chromophors und der Lösungsmittelmoleküle liegt (vgl. Abb. 3-2). Aus diesem Zustand findet die Emission in einen energetisch höher liegenden Grundzustand statt, der durch anschließende Reorientierung der Dipolmomente wieder stabilisiert wird.

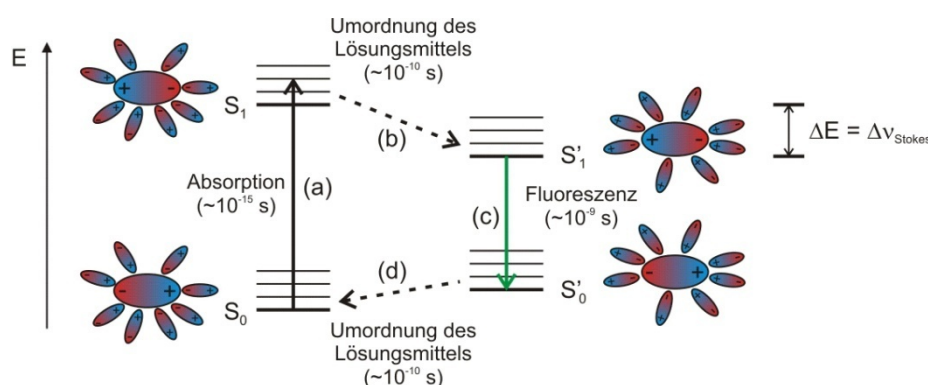


Abb. 3-2: Bathochrom verschobene Fluoreszenzemission in polaren Lösungsmitteln. (a) Absorption und damit verbundene Änderung des Dipolmoments des Moleküls; (b) Stabilisierung des S_1 -Zustands durch antiparallele Ausrichtung der Dipolmomente des Lösungsmittels; (c) Strahlende Relaxation in den energetisch angehobenen S_0 -Zustand; (d) Ausrichtung der Lösungsmitteldipole und Stabilisierung des S_0 -Zustands.

Um die Auswirkungen eines Lösungsmittels auf die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften einer Verbindung abschätzen zu können, ist eine exakte Definition des Begriffs der Lösungsmittelpolarität hilfreich. Dies ist allerdings ein vielschichtiges Problem, da die Wechselwirkungen zwischen gelöster Verbindung und Lösungsmittel sehr umfassend und kompliziert sind und neben den allgemeinen Coulomb-, Richt-, Induktions- und Dispersionswechselwirkungen auch spezifische Effekte wie Wasserstoffbrücken-, Elektronenpaardonor- und Elektronenpaarakzeptor-, sowie solvophobe Wechselwirkungen einschließt.

Allgemeine Lösungsmittelleffekte sind unabhängig von den chemischen Eigenschaften des Fluorophors und des Lösungsmittels. Sie treten aufgrund der elektronischen und der

molekularen Polarisierbarkeit des Lösungsmittels auf. Die elektronische Polarisierbarkeit wird durch den Brechungsindex n beschrieben, die molekulare Polarisierbarkeit ist eine Funktion der Dielektrizitätskonstanten ε und damit auf die Orientierung der Dipole zurück zu führen. Basierend auf elektrostatischen Solvatationsmodellen wurde die Orientierungspolarisation Δf als Parameter zur Quantifizierung der Polarität und der Polarisierbarkeit von Lösungsmitteln vorgeschlagen:

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad \text{Gleichung 3-2}$$

Wird die Verschiebung der Absorptions- und Emissionsspektren lediglich durch allgemeine Lösungsmittelleffekte verursacht und erfolgt die Emission ohne weitere Reaktionen, wie z. B. Proton- oder Ladungstransferprozesse, aus dem angeregten Zustand, so kann die Differenz der Dipolmomente $\Delta\mu$ im Grund- und ersten angeregten Zustand gemäß der *Lippert-Mataga*-Gleichung anhand der Lösungsmittelabhängigkeit des Stokes-Shifts ($\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$) abgeschätzt werden:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{2 \cdot \Delta f}{h \cdot c \cdot a^3} \cdot \Delta\mu^2 + k \quad \text{Gleichung 3-3}$$

a stellt den sog. *Onsager*-Radius des Moleküls dar und die Konstante k berücksichtigt die Empfindlichkeit des gelösten Moleküls gegenüber der Lösungsmittelpolarität. Ergibt sich keine lineare Beziehung aus der Auftragung des Stokes Shifts $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ gegen Δf , deutet dies meist auf zusätzliche *spezifische Lösungsmittelleffekte* hin. Diese beruhen auf zwischenmolekularen Wechselwirkungen des Farbstoffs mit dem Lösungsmittel, wie z. B. Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder Komplexbildung, die durch die chemischen Eigenschaften von Farbstoff und Lösungsmittel verursacht werden. Die Beschreibung aller intermolekularen Wechselwirkungen zwischen gelöster Verbindung und Lösungsmittel ist außerordentlich komplex, was auch erklärt, dass es bislang keine theoretischen Modelle zur Quantifizierung dieser Effekte gibt. Das hat dazu geführt, dass eine Vielzahl von Lösungsmittelpolaritätsskalen auf rein empirischem Wege bestimmt worden ist. Dazu eignen sich bekannte, stark solvensabhängige Prozesse, die als Referenzprozesse in einer möglichst großen Anzahl von Lösungsmitteln untersucht und beispielsweise durch spektroskopische Messungen detektiert werden können. Der wahrscheinlich bekannteste Vertreter der empirischen Parameter der Lösungsmittelpolarität ist der sogenannte $E_T(30)$ -Wert, welcher der molaren Anregungsenergie der π - π^* -Absorption des Pyridiniophenolats

(Merocyanin-Farbstoff) bei 25 °C entspricht.^[65, 67] Mit Hilfe des Absorptionsmaximums $\bar{\nu}$ im entsprechenden Lösungsmittel werden die $E_T(30)$ -Werte nach folgender Gleichung berechnet:

$$E_T(30)[kcal/mol] = h \cdot c \cdot \bar{\nu} \cdot N_A = 2,859 \cdot 10^3 \cdot \bar{\nu}[cm^{-1}] \quad \text{Gleichung 3-4}$$

Aufgrund der guten Löslichkeit des Merocyanin-Farbstoffs sind mittlerweile mehr als 360 Lösungsmittel charakterisiert, was die $E_T(30)$ -Skala zu einer der am häufigsten genutzten Polaritätsskalen macht.^[65]

Ein weiterer wichtiger Vertreter der empirischen Polaritätsskalen ist die sogenannte Donorzahl (DN) eines Lösungsmittels, die die Lewis-Basizität oder Nukleophilie eines Lösungsmittels erfasst. Sie ist definiert als die negative Enthalpie der Reaktion eines Elektronen-Paar-Donor-Lösungsmittels ($EPD-LM$) mit Antimon(V)-chlorid als Standardakzeptor in hochverdünnter 1,2-Dichlorethanlösung:

$$DN \equiv -\Delta H_{EPD-LM+SbCl_3}[kcal/mol] \quad \text{Gleichung 3-5}$$

Die nukleophilen Eigenschaften eines Lösungsmittels werden häufig auch durch den sog. β -Wert repräsentiert, der auf der Verschiebung der Absorptionswellenzahl von 4-Nitroanilin relativ zu N,N -Diethyl-4-nitroanilin in H-Brücken-Akzeptor-Lösungsmitteln ($HBA-LM$) beruht. Als Bezugspunkt dient die relative Verschiebung in Hexamethylphosphorsäuretriamid, einem besonders starken HBA-Lösungsmittel, dessen Wert von $\Delta\Delta\tilde{\nu} = 2800\text{ cm}^{-1}$ auf der β -Skala gleich eins gesetzt wird ($\beta = 1,000$).^[67]

$$\beta = \frac{-\Delta\Delta\tilde{\nu}((4-Nitroanilin) - (N,N-Diethyl-4-nitroanilin))}{2800} \quad \text{Gleichung 3-6}$$

Für einige Lösungsmittel konnte eine gute Korrelation des β -Werts mit der Donornummer gefunden werden:

$$DN = -0,9 + 39,18 \cdot \beta \quad \text{Gleichung 3-7}$$

In Analogie zur Donornummer charakterisiert die sogenannte Akzeptorzahl (AZ) die elektrophilen Eigenschaften eines Elektronen-Paar-Akzeptor-Lösungsmittels ($EPA-LM$). Diese ist definiert als die relative ^{31}P -chemische Verschiebung von Triethylphosphanoxid, wobei die ^{31}P -chemische Verschiebung eines 1:1-Addukts von $\text{Et}_3\text{PO} \cdot \text{SbCl}_5$ in 1,2-Dichlorethan als Referenz willkürlich gleich 100 gesetzt wird. Bei der Berechnung der Akzeptorzahl stellt δ_{kor} die auf n -Hexan bezogene, bezüglich der Differenz der Volumenssuszeptibilitäten

korrigierte, lösungsmittelabhängige ^{31}P -chemische Verschiebung von Triethylphosphanoxid dar.

$$AN \equiv \frac{\delta_{\text{kor}}}{\delta_{\text{kor}}(\text{Et}_3\text{PO} - \text{SbCl}_5)} \cdot 100 = \delta_{\text{kor}} \cdot 2,348 \quad \text{Gleichung 3-8}$$

Die Korrelation eines Lösungsmittelpolaritätsparameters mit den Absorptions- und/ oder Fluoreszenzeigenschaften eines Farbstoffs kann u. U. Aufschluss darüber geben, ob und wodurch Grund- und angeregter Zustand stabilisiert bzw. destabilisiert werden.

Auch die Anwesenheit von DNA kann signifikante Auswirkungen auf die Absorptions- und Emissionseigenschaften eines Fluorophors haben. Meist beobachtet man eine bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums und eine deutliche Abnahme des Extinktionskoeffizienten (*Hypochromie*).^[68] Außerdem treten bei spektrophotometrischen Titrationsen mit DNA häufig sog. isobestische Punkte auf, was darauf hindeutet, dass zwei unterschiedliche absorbierende Spezies im Gleichgewicht vorliegen. Fluoreszenzspektren von Interkalatoren weisen aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen im Inneren des Basenstapels im Allgemeinen eine *hypsochrome* Verschiebung auf. Die Intensität der Emission wird ebenfalls stark beeinflusst, was sowohl eine Erhöhung als auch eine Löschung der Fluoreszenzintensität zur Folge haben kann, die in den meisten Fällen auf einem Ladungstransfer zwischen dem angeregten Fluorophor und den DNA-Basen zurück zu führen ist (vgl. Kapitel 4.5.2).

3.2.2. Reaktionen im angeregten Zustand: Vorstellung des TICT-Konzepts

Mit Reaktionen im angeregten Zustand sind molekulare Prozesse gemeint, die zu strukturellen Änderungen des angeregten Fluorophors führen und unmittelbar nach dessen Anregung auftreten, d. h. dass die entsprechende angeregte Spezies nicht direkt aus dem Grundzustand angeregt werden kann, sondern sich erst aus den ursprünglich angeregten Molekülen bildet. Diese Reaktionen finden statt, wenn sich die Elektronenverteilung innerhalb des Fluorophors durch Lichtabsorption ändert, was Auswirkungen auf die chemischen und/ oder physikalischen Eigenschaften der Verbindungen und damit auch auf die Lage und Intensität der Fluoreszenzspektren haben kann.

Ein typisches Beispiel ist die Abspaltung oder Aufnahme eines Protons im angeregten Zustand, da sich die veränderte Elektronenverteilung des Chromophors auf dessen Acidität bzw. Basizität stark auswirken kann. Durch Protonierung oder Deprotonierung kann die Anregungsenergie strahlungslos abgegeben werden, was zu einer verringerten Fluoreszenz-

intensität führt (vgl. Kapitel 3.5, postulierter Mechanismus zur Löschung der Fluoreszenz von Ethidium in wässriger Lösung). Auch die Bildung von Excimeren oder Exiplexen sowie Lösungsmittel- und konformationelle Relaxationsprozesse gehören zu den Reaktionen im angeregten Zustand.

Rhodamin-Farbstoffe sind schon seit längerer Zeit für ihre hohen Quantenausbeuten bekannt (z. B. Rhodamin B in Ethanol: $\Phi_F = 0,49$).^[69] Malachitgrün (MG) oder Kristallviolett (CV), deren Struktur denen der Rhodamin-Derivate bis auf eine fehlende Bindung zwischen den Dialkylanilin-Gruppen sehr ähnlich ist, weisen in Lösung dagegen extrem geringe Quantenausbeuten auf. Wird bei MG oder CV die Beweglichkeit der Dialkylanilin-Gruppen eingeschränkt oder komplett verhindert, z. B. durch Erhöhung der Viskosität des Lösungsmittels, steigt auch deren Quantenausbeute stark an.^[70-72] Offensichtlich eröffnet die Rotationsfreiheit der Dialkylanilin-Gruppen in diesen Verbindungen einen neuen Reaktionsweg-Kanal (*channel*) zur strahlungslosen Abgabe der Anregungsenergie. Man geht davon aus, dass der Mechanismus dieser strahlungslosen Relaxation mit einem Ladungstransferprozess zusammenhängt,^[71-74] was bedeutet, dass dieser Reaktionsweg-Kanal nur dann entsteht, wenn die drehbare Gruppe einen ausreichend guten Elektronen-Donor darstellt. Dies wurde am Beispiel eines donormodifizierten Rhodamin-Derivats (ARh, vgl. Abb. 3-3) gezeigt, das eine frei drehbare Dialkylaminophenyl-Gruppe enthielt und dessen Fluoreszenz in Lösung stark gelöscht war. Nach Protonierung der Aminofunktion, was den starken Elektronen-Donor-Substituenten in einen schwachen Elektronen-Akzeptor-Substituenten verwandelte, verschwand der strahlungslose Reaktionsweg-Kanal (*channel*) und man erhielt einen Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute um den Faktor 290.^[75]

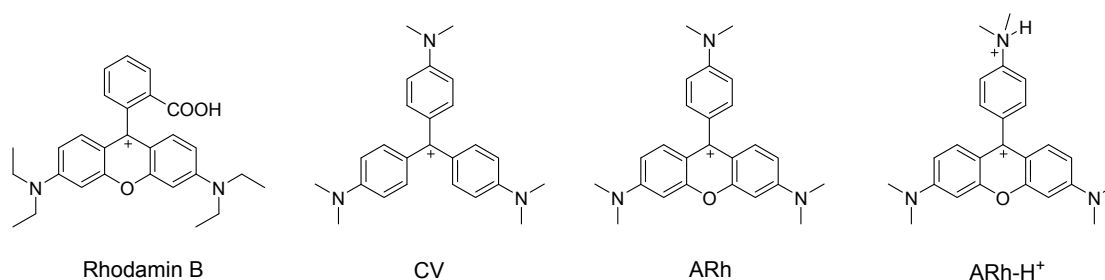


Abb. 3-3: Strukturen von Rhodamin B und der von der Arbeitsgruppe *Rettig* untersuchten Rhodamin-Derivate.^[71, 72, 75]

Dieses Phänomen lässt sich durch das Konzept der „verdrillten intramolekularen Ladungstransferzustände“ oder kurz TICT-Zustände (*Twisted Intramolecular Charge Transfer*) erklären. Die Theorie beruht auf einer Kombination von Ladungstransfer und intramolekularer Verdrillung, wobei nach Anregung ein Elektron vom Donor-Substituenten

auf das Akzeptor-System übertragen wird und das angeregte Molekül durch eine spontane Verdrillung des 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituenten eine orthogonale Konformation einnimmt, was eine Entkopplung der Elektronen-Donor-Gruppe vom Akzeptor-System zur Folge hat.^[73, 76] Geht man von einer Verdrillung des Donor-Substituenten um 90° aus, so ergeben sich für die Ladungsverteilung zwei Möglichkeiten (vgl. Abb. 3-4). Entweder befindet sich ein Elektron des Donors komplett auf dem Akzeptor-System, oder es findet kein Ladungstransfer statt und das freie Elektronenpaar ist weiterhin hauptsächlich auf der Donor-Gruppe lokalisiert. In diesem Fall wird der zugehörige angeregte Zustand als „lokal angeregt“ (LE, *locally excited*) bezeichnet. Vergleicht man einen LE-Zustand mit einem CT-Zustand, stellt man fest, dass sich das ursprünglich freie Elektronenpaar des Donors an unterschiedlichen Stellen im Molekül befindet. Der Ladungstransferprozess, der von einem LE- in einen CT-Zustand führt, ist demnach mit der Verschiebung eines Elektrons in Richtung des Akzeptor-Systems verbunden. Befindet sich der CT-Zustand in energetischer Reichweite von der S_1 Potentialhyperfläche, kann er von dem sich zunächst im Gleichgewicht befindenden angeregten LE-Zustand, in dem das freie Elektronenpaar hauptsächlich am Donor-Substituenten lokalisiert ist, populiert werden. Auch die Wahl des Lösungsmittels hat Einfluss auf die Art des angeregten Zustands: Während in unpolaren Lösungsmitteln Fluoreszenz meist aus dem LE-Zustand erfolgt, tritt in polaren Lösungsmitteln eine starke Stabilisierung des TICT-Zustands ein, so dass die Fluoreszenz hauptsächlich aus diesem Zustand erfolgt.

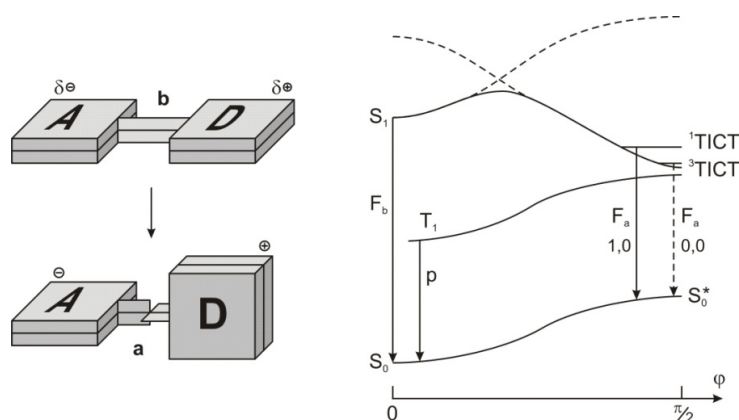


Abb. 3-4: Links: Schematische Darstellung, welche die Änderung der geometrischen Anordnung von Donorgruppe (D) und Akzeptorgruppe (A) beim Übergang vom LE - in den TICT-Zustand zeigt. Dieser Übergang beinhaltet eine intramolekulare Rotation, den Transfer von annähernd einer Ladungseinheit und die Relaxation der polaren Lösungsmittelmoleküle um diesen vergrößerten Dipol.^[73, 76] Rechts: Schematische Darstellung der Energieterme in Abhängigkeit des Torsionswinkels ϕ für Moleküle, die TICT-Zustände ausbilden (F: Fluoreszenz; P: Phosphoreszenz; b: koplanare Konformation; a: verdrillte Konformation).

Da der strahlende Übergang vom TICT-Zustand in den Grundzustand (Rückladungstransfer) zwei π -Orbitale betrifft, die im Mittel senkrecht aufeinander stehen, ist er überlappungsverboten, d. h. dass die Übergangswahrscheinlichkeit gering ist.^[73] Daher zerfällt der angeregte TICT-Zustand häufig schneller durch strahlungslose Desaktivierungsprozesse, was sich in einer deutlich verminderten Fluoreszenzquantenausbeute bemerkbar macht.

In einigen Fällen scheinen TICT-Zustände auch für das Auftreten von sog. dualer Fluoreszenz verantwortlich zu sein. Das bekannteste Beispiel stellt dabei *p*-*N,N*-Dimethylaminobenzonitril (DMABN) dar, das zusammen mit einer Reihe von strukturell ähnlichen Modellverbindungen (vgl. Abb. 3-5), insbesondere von den Arbeitsgruppen *Rotkiewicz* und *Grabowski* ausführlich untersucht wurde.^[76-79] Bei diesen Modellverbindungen handelt es sich um DMABN-Derivate, in denen die Dialkylamino-Gruppe in der planaren oder in der senkrechten Position fixiert ist oder in denen die planare Anordnung der Dialkylamino-Gruppe durch *ortho*-Substitution im Benzolring erschwert wird. Je nach Anordnung der Dialkylamino-Gruppe wurden entweder LE- oder TICT-Fluoreszenz oder beide Arten der Fluoreszenz detektiert. *Zachariasse et al.* konnten zeigen, dass duale Fluoreszenz nur dann auftritt, wenn der energetische Abstand zwischen dem S_1 - und dem S_2 -Zustand gering ist (vgl. Abb. 3-5).^[80, 81]

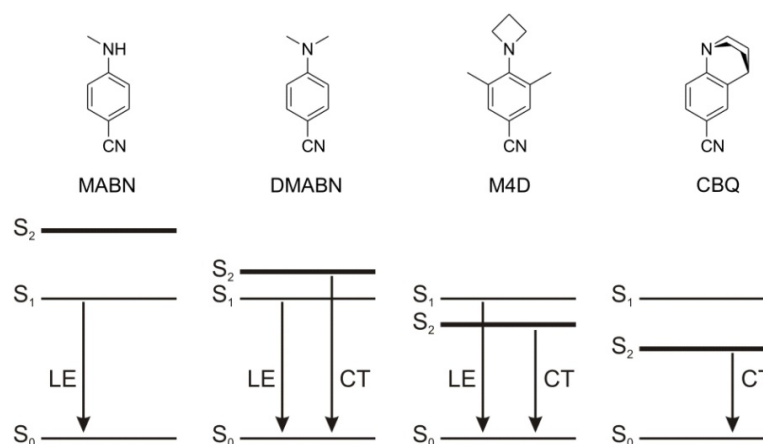


Abb. 3-5: Zusammenhang zwischen dem energetischen Abstand des S_1 - und S_2 -Zustands und dem Auftreten von dualer Fluoreszenz (fettgedruckte Linie: CT-Zustand; MABN: *p*-*N*-Methylaminobenzonitril; DMABN: *p*-*N,N*-Dimethylaminobenzonitril; M4D: *p*-(*N*-Azetidiny)-3,5-dimethylbenzonitril; CBQ: 9,9'-Bianthryl-6-cyano-benzoquinoklidin).^[80]

Man geht davon aus, dass TICT-Zustände, neben ihrer Bedeutung für die Entwicklung neuer Laserfarbstoffe und Fluoreszenzsonden, auch zum grundlegenden Verständnis photo-biologischer Primärprozesse, z. B. bei der Photosynthese, beitragen können. Die Speicherung von Lichtenergie, die für chemische Reaktionen bereitgestellt werden soll, erfolgt in den

Photosystemen grüner Pflanzen und photosynthetisch aktiven Bakterien über Ladungstrennung. Gemäß der Röntgenstrukturanalyse des Reaktionszentrums dieser Bakterien werden die beteiligten Chromophore, die sich sowohl chemisch als auch elektronisch sehr ähnlich sind, durch Einbettung in ein Proteingerüst in einer Anordnung der kleinsten Überlappung gehalten. Als Gründe dafür vermutet man, im Einklang mit dem TICT-Konzept, dass so ein möglichst geringer Energieverlust durch isoenergetische Niveaus, ein möglichst guter Elektronentransport und eine deutlich reduzierte Rückreaktionsgeschwindigkeit aufgrund nahezu entkoppelter Orbitale gewährleistet wird.^[73]

3.2.3. Bestimmung der Bindungskonstanten: Theorie von McGhee und von Hippel

Üblicherweise basiert die Bestimmung von Bindungskonstanten K und der Anzahl n belegter Bindungsplätze pro Ligand auf einer *Langmuir*-Adsorptionsisotherme:^[82]

$$r = \frac{n \cdot K \cdot [L_f]}{1 + K \cdot [L_f]} \quad \text{Gleichung 3-9}$$

Hierbei stellt r den Quotienten aus den Konzentrationen der gebundenen Liganden $[L_b]$ und des Substrats (z. B. DNA) dar und wird oft als Bindungsdichte bezeichnet.

$$r = \frac{[L_b]}{[S_0]} \quad \text{Gleichung 3-10}$$

Zur Auswertung benötigt man neben der Konzentration an freiem Liganden $[L_f]$, die direkt aus Messungen (z. B. UV/Vis-Spektroskopie) erhalten werden kann, auch die Menge an freiem Substrat im Gleichgewicht. Da diese meist nicht einfach zu bestimmen ist, werden die Messungen üblicherweise mit einem großen Überschuss an Substrat durchgeführt, so dass man näherungsweise davon ausgehen kann, dass die Gleichgewichtskonzentration an freiem Substrat der Ausgangskonzentration $[S_0]$ entspricht.

Durch Umformen der Gleichung 3-9 erhält man die sog. *Scatchard*-Darstellung der Bindungsisotherme:^[61, 82, 83]

$$\frac{r}{[L_f]} = K \cdot (n - r) \quad \text{Gleichung 3-11}$$

Aus der Auftragung der Messwerte in Form von $r/[L_f]$ gegen r ergibt sich eine Gerade aus deren Steigung und Achsenabschnitt man die Parameter K und n erhält. Neben der x-rezi-

proben *Scatchard*-Darstellung haben sich auch noch die y-reziproke Auftragung durch *Scott*^[61, 84] und der doppelt-reziproke *Benesi-Hildebrand*-Plot^[61, 85] zur Bestimmung der Parameter K und n in der Literatur etabliert.

Ergibt sich bei den Auftragungen keine Gerade, kann das untersuchte System nicht durch eine einfache *Langmuir*-Adsorptionsisotherme beschrieben werden. Dies kann unter anderem an attraktiven oder repulsiven Wechselwirkungen oder an der Existenz verschiedenartiger Koordinationsplätze liegen. Speziell für den Fall der Adsorption von nicht-sequenzspezifisch bindenden Proteinen an DNA haben *McGhee* und *von Hippel* 1974 ein Modell zur Bestimmung der Bindungskonstanten K und der Zahl der belegten Bindungsplätze pro Ligand n entwickelt, das auch auf die Wechselwirkung von Antibiotika, Farbstoffen und Metallkomplexen mit DNA angewandt werden kann.^[37, 86] Als Gedankenmodell diente eine lineare Abfolge von N gleichartigen Bindungsstellen, z. B. DNA-Basen, an einer Oberfläche. Ein Molekül besetzt bei Komplexbildung n nebeneinanderliegende Stellen (n Stellen entsprechen einem Platz), wobei eine „Halbkomplexierung“ oder Überlappung ausgeschlossen werden muss, sodass lediglich der freie Ligand und das gebundene Assoziat als unterscheidbare Spezies vorliegen. Unter dieser Voraussetzung ergeben sich für ein gebundenes Molekül drei Situationen, isoliert (*isolated*), einfach benachbart (*singly contiguous*) und zweifach benachbart (*doubly contiguous*), für die im Falle von Nichtkooperativität die Bindungskonstante gleich groß ist (vgl. Abb. 3-6).

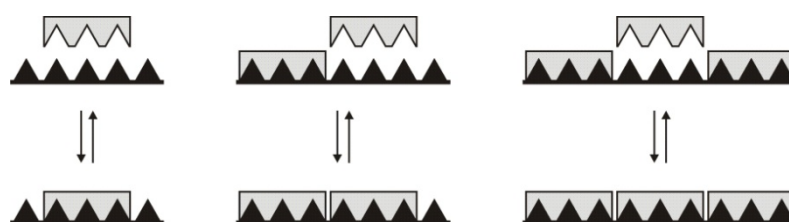


Abb. 3-6: Schematische Darstellungen der drei möglichen Bindungssituationen eines Moleküls, das drei Bindungsstellen auf der Oberfläche belegt.

Im Gegensatz zur Betrachtung nach *Scatchard*, die ursprünglich für die Wechselwirkung kleiner Liganden mit diskreten, isolierten Bindungsstellen benutzt wurde, unterscheiden sich hier die Bindungsstellen abhängig von der Belegungssituation. Für eine unbelegte Oberfläche stehen nach dem Modell $N-n+1$ Bindungsplätze zur Verfügung. Abb. 3-7 (links) veranschaulicht, dass nach Bindung eines Liganden, der mehrere Plätze belegt, die benachbarten Stellen für eine weitere Belegung teilweise unzugänglich werden. Auch eine Belegung

zwischen zwei bereits komplexierten Liganden kann zu einem Verlust von potentiellen Bindungsstellen führen (vgl. Abb. 3-7, rechts).

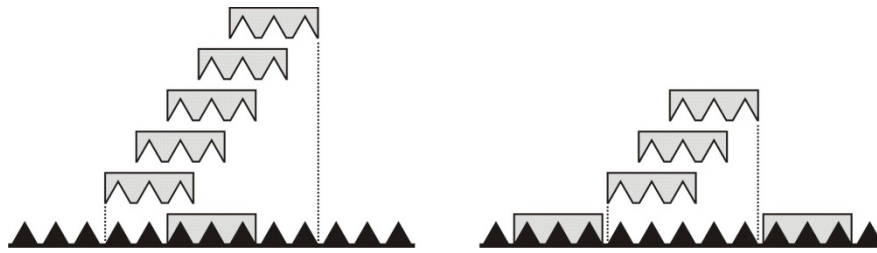


Abb. 3-7: Links: Schematische Darstellung des Ausschlusses möglicher Bindungsplätze durch ein komplexiertes Molekül. Rechts: Mögliche Bindungsplätze zwischen zwei bereits komplexierten Liganden.

Die Zahl potentieller Bindungsplätze, die ein Ligand blockieren kann, reicht von 1 (für eine Komplexierung in eine Lücke der Länge n) bis hin zu $2n-1$ (für die Bindung an eine bislang unbedeckte Oberfläche). Das bedeutet auch, dass eine Lücke der Größe g (Zahl der freien Bindungsstellen zwischen zwei Liganden) $g-n+1$ freie Bindungsplätze enthält, vorausgesetzt $g \geq n$. Für $g < n$ steht kein Bindungsplatz zur Verfügung. Eine komplette Sättigung der Oberfläche, wie bei *Scatchard* angenommen, wird somit sehr unwahrscheinlich.

Unter Berücksichtigung der genannten Voraussetzungen und der Annahme, dass N gegen unendlich geht, wurde mittels statistischer Methoden die Wahrscheinlichkeit dafür berechnet, dass eine Lücke genau g Stellen lang ist. Daraus erhält man die durchschnittliche Zahl freier Bindungsplätze pro Lücke und damit auch die freien Bindungsplätze pro Oberfläche. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten K und der Zahl der belegten Bindungsplätze pro Gastmolekül n ergibt sich für nicht-kooperative Liganden schließlich folgende Gleichung:

$$\frac{r}{[L_f]} = K \cdot (1 - n \cdot r) \cdot \left(\frac{1 - n \cdot r}{1 - (n-1) \cdot r} \right)^{n-1} \quad \text{Gleichung 3-12}$$

Die Bindungsdichte r ist, wie bereits erwähnt, definiert als Quotient aus der Konzentration an gebundenem Liganden $[L_b]$ und der insgesamt zur Verfügung stehenden Bindungsplätze (DNA-Basenpaare, *DNA-Bp*):

$$r = \frac{[L_b]}{[DNA - Bp]} \quad \text{Gleichung 3-13}$$

Um r und damit auch K und n bestimmen zu können, benötigt man die genaue Kenntnis der Konzentrationen von freiem und gebundenem Liganden, $[L_f]$ und $[L_b]$. Diese erhält man aus Messungen, in denen die experimentellen Daten linear mit der Änderung des Verhältnisses

von freiem zu gebundenem Farbstoff zusammenhängen, z. B. chemische Verschiebung in der NMR-Spektroskopie oder Intensitätsänderungen in der UV/Vis- bzw. Fluoreszenzspektroskopie. Das Modell von *McGhee* und *von Hippel* besitzt nur Gültigkeit für den Fall, dass der Ligand entweder in gebundener oder freier Form vorliegt, wodurch gilt:

$$[L_f] = [L_0] - [L_b] \quad \text{Gleichung 3-14}$$

Die Parameter K und n wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Absorptionstitrationen bestimmt. Um eine Verdünnung der Farbstofflösung in der Küvette zu vermeiden, enthielt die Titrationslösung neben DNA auch Farbstoff in gleicher Konzentration wie er in der Küvette vorgelegt wurde. Wird die Titration bis zur vollständigen Sättigung durchgeführt, kann die Sättigungsfraction (SF) und die Konzentration des gebundenen Liganden $[L_b]$ direkt aus den Daten der UV/Vis-Messungen berechnet werden:

$$SF = \frac{A_f - A}{A_f - A_b} \quad \text{Gleichung 3-15}$$

$$[L_b] = [L_0] \cdot SF = [L_0] \cdot \frac{A_f - A}{A_f - A_b} \quad \text{Gleichung 3-16}$$

Dazu benötigt man neben der Gesamtkonzentration des Liganden $[L_0]$ auch die Extinktion bei einer konstanten Wellenlänge (in der Regel am Absorptionsmaximum des freien oder vollständig gebundenen Liganden) für jedes gemessene Ligand-zu-DNA-Verhältnis (A), sowie für den freien (A_f) und den vollständig gebundenen Liganden (A_b).

Die graphischen Auftragung $r/[L_f]$ gegen r kann mit Hilfe des *Levenberg-Marquardt*-Algorithmus numerisch gefittet werden (Gleichung 3-12), wodurch man die Bindungskonstante K und die Zahl der belegten Bindungsplätze pro Gastmolekül n bestimmen kann.

3.2.4. Berechnung der Fluoreszenzlebenszeiten nach *Strickler* und *Berg* und Bestimmung der *Arrhenius*-Parameter

Alternativ zur direkten Messung^[64, 65] der Fluoreszenzlebenszeit τ_F eines Moleküls mittels zeitkorrelierter Einzelphotonenzählung (TCSPC; *time-correlated single photon counting*) oder Phasenfluorometrie kann τ_F auch mit Hilfe der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F berechnet werden.^[87]

$$\tau_F = \Phi_F \cdot \tau_0$$

Gleichung 3-17

Dazu wird die sog. „natürliche“ Fluoreszenzlebensdauer τ_0 benötigt, die einer oberen Grenze der Fluoreszenzlebensdauer bei Abwesenheit aller strahlungslosen Prozesse entspricht. Eine Abschätzung der „natürlichen“ Fluoreszenzlebensdauer τ_0 und der zugehörigen Rate k_r leiteten *Strickler* und *Berg* aus dem Zusammenhang zwischen Absorption und Emission her:^[87]

$$k_r = \frac{1}{\tau_0} = 2,880 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 \cdot \left\langle \tilde{\nu}_F^{-3} \right\rangle_{Av}^{-1} \cdot \frac{g_l}{g_u} \int \varepsilon(\tilde{\nu}) d \ln \tilde{\nu}$$

Gleichung 3-18

Dabei ist n der Brechungsindex des Mediums, g_l und g_u sind die Multiplizitäten des oberen (*upper*) und unteren (*lower*) Zustands und $\varepsilon(\tilde{\nu})$ der molare Extinktionskoeffizient in Abhängigkeit von der Frequenz in Wellenzahlen (d.h. das Absorptionsspektrum). Integriert wird über den gesamten Wellenzahlbereich der S_0 - S_1 -Absorptions- bzw. der S_0 - S_1 -Fluoreszenzbande. Der Ausdruck $\left\langle \tilde{\nu}_F^{-3} \right\rangle_{Av}^{-1}$ berechnet sich aus dem stationären Fluoreszenzspektrum der Probe gemäß:

$$\left\langle \tilde{\nu}_F^{-3} \right\rangle_{Av}^{-1} = \frac{\int I(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int \tilde{\nu}^{-3} I(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}$$

Gleichung 3-19

$\tilde{\nu}$ bezeichnet die Frequenz in Wellenzahlen und $I(\tilde{\nu})$ die spektrale Photonenanzahldichte.

Die Herleitung dieser Gleichung basiert auf der Regel von *Kasha*, wonach die Emission stets aus dem Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands (= E_{00} -Übergang) erfolgt.^[88] Außerdem wird angenommen, dass der Zustand, der die langwelligste Absorptionsbande bewirkt, der gleiche ist, aus dem die Emission stattfindet. Um die *Strickler-Berg*-Beziehung zur Berechnung der „natürlichen“ Fluoreszenzlebenszeit sinnvoll anwenden zu können, ist es darüber hinaus erforderlich, dass folgende Voraussetzungen (zumindest teilweise) erfüllt werden:^[87, 89]

- Es sollte sich um einen starken, d. h. elektronisch erlaubten Übergang handeln.
- Das Übergangsdipolmoment sollte möglichst unabhängig von den Kernkoordinaten sein und seine Konfiguration im angeregten Zustand möglichst beibehalten.
- Die langwelligste Bande im Absorptionsspektrum sollte gut von den restlichen Banden abgetrennt sein und möglichst ein „Spiegelbild“ des Fluoreszenzspektrums darstellen. Für den Fall, dass die erste Absorptionsbande durch einen zweiten,

stärkeren Übergang überlagert wird (vgl. Abb. 3-8), ist es nötig, die energetisch niedrigste Bande zu extrapolieren, z. B. mit Hilfe einer Gauss-Näherung.

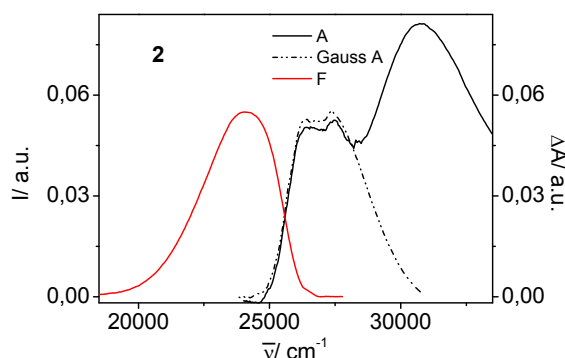


Abb. 3-8: Absorption- und Fluoreszenzspektrum von **2** sowie Extrapolation der energetisch niedrigsten Absorptionsbande.

Mit Hilfe der *Strickler-Berg*-Gleichung und Gleichung 3-17 wurden die Fluoreszenzlebenszeiten τ_F der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** in Glycerin bei verschiedenen Temperaturen bestimmt (vgl. Kapitel 4.6.3 und Kapitel 7.3.4).

Die Ergebnisse der temperaturabhängigen Bestimmung von Fluoreszenzlebenszeit τ_F und Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F können genutzt werden, um die Aktivierungsenergie E_A der strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustands gemäß der *Arrhenius*-Gleichung zu ermitteln:

$$k_{nr} = A \cdot e^{\frac{-E_A}{R \cdot T}} \quad \text{Gleichung 3-20}$$

Dazu wird die Rate der strahlenden (k_r) und der strahlungslosen Relaxation (k_{nr}) des angeregten Zustands benötigt, die aus der Fluoreszenzlebenszeit τ_F eines Moleküls und seiner Quantenausbeute Φ_F berechnet werden kann:^[69]

$$k_r = \frac{\Phi_F}{\tau_F} \quad \text{Gleichung 3-21}$$

$$k_{nr} = \frac{1}{\tau_F} - k_r \quad \text{Gleichung 3-22}$$

Aus der Auftragung von $\ln(k_{nr})$ gegen $1/T$ erhält man den präexponentiellen Faktor A durch delogarithmieren des Achsenabschnitts, während sich die Aktivierungsenergie E_A aus der Steigung multipliziert mit der idealen Gaskonstanten berechnen lässt.

3.3. Ladungstransfer in DNA

Je nach Art der transportierten Ladung unterscheidet man zwischen oxidativem Loch- und reduktivem Elektronentransfer. Obwohl beide Ladungstransferprozesse die Bewegung von Elektronen durch die DNA beschreiben, kann der Lochtransfer nicht als Elektronentransfer in entgegengesetzter Richtung verstanden werden. Betrachtet man die Mechanismen der beiden Prozesse, so erkennt man, dass der grundlegende Unterschied in den beteiligten Orbitalen zu finden ist. Während der oxidative Lochtransfer HOMO-kontrolliert erfolgt (Abb. 3-9), läuft der reduktive Elektronentransfer unter LUMO-Kontrolle ab (Abb. 3-10).

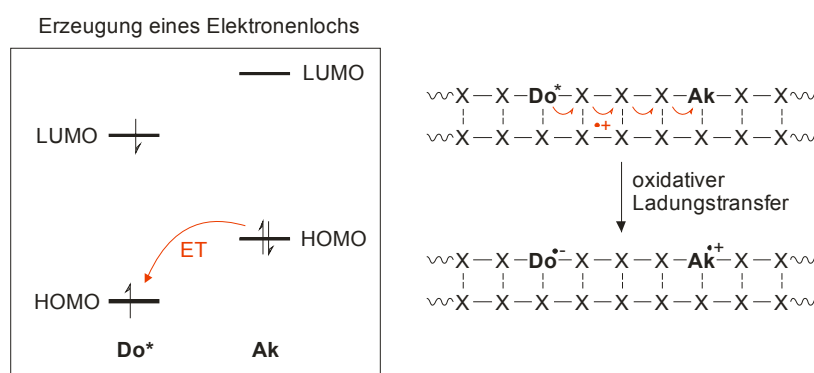


Abb. 3-9: Schema des oxidativen Lochtransfers. Ein Elektron aus dem HOMO des Ladungsakzeptors Ak wird in das HOMO des angeregten Ladungsdonors Do^* übertragen.

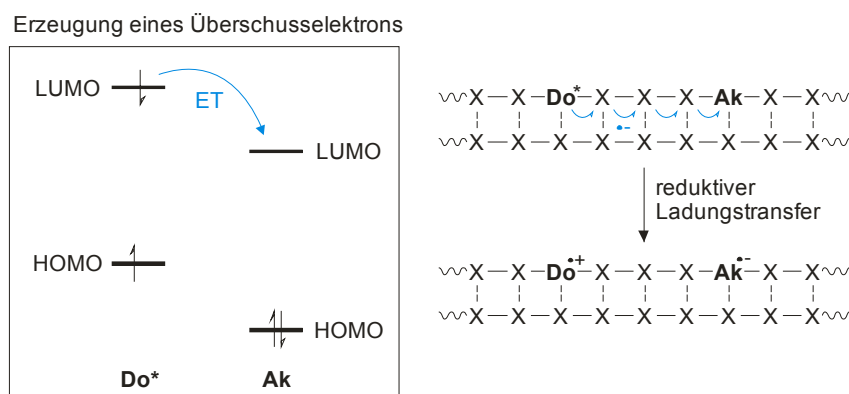


Abb.3-10: Schema des reduktiven Elektronentransfers. Ein Elektron aus dem LUMO des angeregten Ladungsdonors Do^* wird in das LUMO des Ladungsakzeptors Ak übertragen.

Das Interesse an Ladungstransferprozessen in DNA wuchs mit der Erkenntnis, dass oxidative Schädigungen des Erbgutes eine zentrale Rolle bei Mutagenese, Apoptose und Krebsentstehung spielen.^[90-92] Reduktiver Elektronentransfer scheint hingegen von deutlich geringerer biologischer Bedeutung für den Menschen zu sein. Lediglich in Basenexzisions-

Reparaturprozessen spielt reduktiver Ladungstransfer möglicherweise eine Rolle, wie *Barton et. al* vorschlugen.^[93-96] Entsprechende Untersuchungen werden in Kapitel 3.4 genauer erläutert. Bislang konnte keine Schädigung der DNA nachgewiesen werden, die auf reduktiven Ladungstransfer zurück zu führen ist.

Der Durchbruch zur Untersuchung von Ladungstransferprozessen in DNA gelang erst durch die Entwicklung der automatisierten Festphasensynthese, die eine systematische Erforschung an definierten Basensequenzen ermöglichte.^[97-99] Mittlerweile ist die Vorstellung vom Ladungstransport durch den DNA-Basenstapel allgemein akzeptiert und die Diskussion hat sich vom Mechanismus, zur Frage der biologischen Relevanz und der technischen Anwendungsmöglichkeiten hin verlagert.

3.3.1. Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden

Die natürlichen Nukleoside A, C, G und T zeigen bei Raumtemperatur keine Fluoreszenz.^[100] Zur Erforschung des Ladungstransfers ist es daher nötig, DNA mit redoxaktiven Sonden, die zur Erzeugung und auch zum Abfangen der Ladung benötigt werden, zu modifizieren. Die Art der Anknüpfung ist abhängig von der verwendeten aktiven Verbindung, der gewünschten sterischen Anordnung und der synthetischen Zugänglichkeit des entsprechenden Bausteins. Die Einführung der Sonden in die DNA kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen,^[101] die im Folgenden erläutert werden:

- Einbau einer redoxaktiven Sonde als artifizielle Nukleobase (Abb. 3-11). Als Donor oder Akzeptor wird synthetisch ein Basensurrogat hergestellt, das über eine 2'-Desoxyribose- oder eine acyclische Linkereinheit kovalent in das Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat verankert wird.^[27, 102-104]

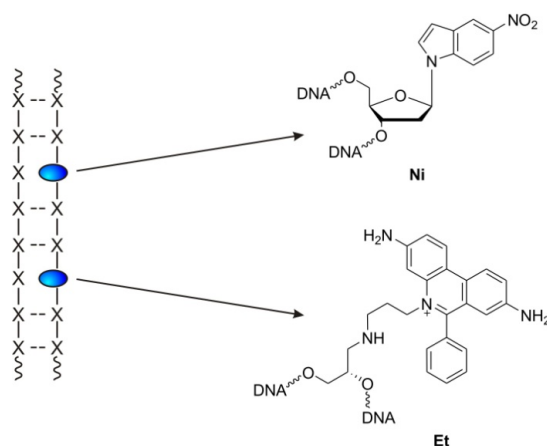


Abb. 3-11: Modifikation der DNA mit artifiziellen Basensurrogaten. Beispiele: 5-Nitroindol (**Ni**)^[105, 106] und Ethidium (**Et**).^[27, 102-104]

- Modifikation eines natürlichen Nukleosids mit einer redoxaktiven Gruppe (Abb. 3-12). Der Einbau modifizierter Nukleoside in den Basenstapel gelingt über Standardsynthesemethoden (z. B. **PydG**,^[107] **2PydU**,^[108] **BODIPYdU**^[109]) oder durch chemische Umsetzung von Vorläufermolekülen an der festen Phase (z. B. *Pyin*-Nucleoside^[110-113]) bzw. nach Abspaltung von der festen Phase (z. B. Methylviologen-Uridin (**MV**)). Die redoxaktive Gruppe sollte im Idealfall in Richtung der großen Furche ragen, so dass die Basenpaarung möglichst wenig gestört wird.

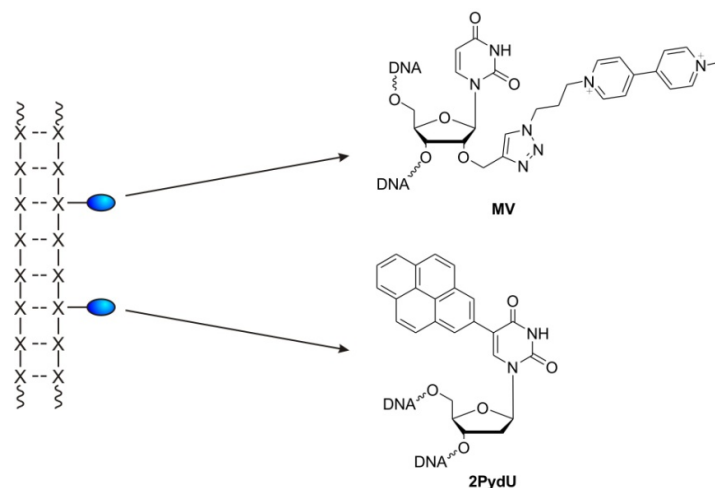


Abb. 3-12: Modifikation eines natürlichen Nukleosids mit Pyren (**2PydU**) und mit Methylviologen (**MV**).

- Einbau der Sonde als Kopfgruppe einer DNA-Haarnadel (Abb. 3-13, links). Die Modifikation ist über Linkereinheiten mit zwei komplementären DNA-Sequenzen verknüpft.^[114-119] Bildet sich ein Doppelstrang aus, so kommt die reaktive Gruppe auf dem Basenstapel zum Liegen. Diese Haarnadelstrukturen sind sehr stabil, nehmen meist eine B-DNA-Konformation an und dissoziieren erst bei hoher Temperatur.
- Anknüpfung der Sonde über eine lange Linkereinheit (Abb. 3-13, rechts). Der Linker kann entweder am 3'- bzw. 5'-Ende der DNA oder innerhalb der DNA-Sequenz befestigt werden.^[120, 121] Die Verwendung einer langen Linkergruppe gewährleistet die bestmögliche konformative Freiheit für die Interkalation in den Basenstapel. Die Position der Interkalation kann durch Variation der Linkerlänge beeinflusst werden, exakt definiert werden kann sie jedoch nicht.



Abb.3-13: Links: Redoxaktive Sonde als Haarnadel-Kopfgruppe. Rechts: Interkalator mit Linkereinheit.

Eine Abschätzung der Triebkraft ΔG_{CT} einer Ladungstransferreaktion (CT: *charge transfer*) kann mit Hilfe der *Rehm-Weller*-Gleichung erfolgen:^[122, 123]

$$\Delta G_{CT} = e \cdot [E_{ox} - E_{red}] - E_{00} + C \quad \text{Gleichung 3-23}$$

Dazu wird das Oxidations- (E_{ox}) und Redoxpotential (E_{red}) des Donors und des Akzeptors im Grundzustand benötigt, die mittels Cyclovoltammetriemessungen bestimmt werden können. Die Änderung der *Coulomb*-Energie C ist meist gering und kann daher vernachlässigt werden. E_{00} ist die Energie des HOMO-LUMO-Übergangs, die aus dem Schnittpunkt der normierten Absorptions- und der Fluoreszenzspektren erhalten werden kann. Abb. 3-14 zeigt die graphische Bestimmung des Schnittpunkts λ für Ethidium (E, Struktur vgl. Abb. 3-1). Die Singulett-Energie E_{00} kann dann nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$E_{00} = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad \text{Gleichung 3-24}$$

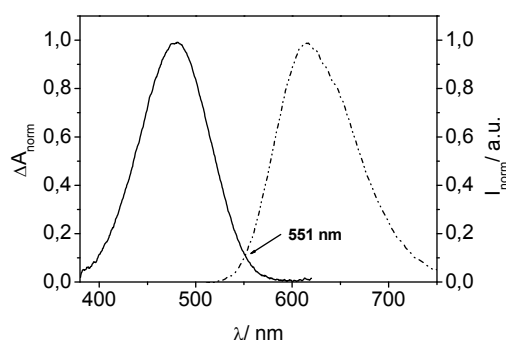


Abb. 3-14: Graphische Bestimmung des Schnittpunkts zwischen normierter Absorption und normierter Fluoreszenz von E.

Abhängig vom jeweiligen Ladungstransfer erhält man die Potentiale des angeregten Zustands des Donors (Do) für den oxidativen Lochtransfer (HT: *hole transfer*) und den reduktiven Elektronentransfer (ET: *electron transfer*) näherungsweise aus folgenden Gleichungen:

$$\text{Oxidativer Lochtransfer:} \quad E_{red}^*(Do) = E_{red}(Do) + E_{00} \quad \text{Gleichung 3-25}$$

$$\text{Reduktiver Elektronentransfer:} \quad E_{ox}^*(Do) = E_{ox}(Do) - E_{00} \quad \text{Gleichung 3-26}$$

Die Bestimmung der Redoxpotentiale der natürlichen bzw. der modifizierten Nukleotide in DNA ist schwierig, da sie durch die starken Wechselwirkungen aller Nukleobasen untereinander auch von der bestehenden DNA-Sequenz abhängen. Daher liefern isoliert

betrachtete Redoxpotentiale der Nukleotide lediglich einen Anhaltspunkt zur Abschätzung der Redoxvorgänge, der tatsächliche Ablauf muss experimentell bestätigt werden.

3.3.2. Oxidativer Ladungstransfer

Aufgrund der biologischen Relevanz konzentrierte sich das Interesse zu Beginn der Studien 1986 (*Barton et al.*)^[124] ausschließlich auf den oxidativen Lochtransfer. Zunächst wurden die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen gemäß der Elektronentransfertheorie von *Marcus*^[125] gedeutet. Demnach erfolgt der Ladungstransfer in einem Schritt vom Ladungsdonor (Do) zum Akzeptor (Ak), ohne dass die Ladung auf einer dazwischen liegenden DNA-Base lokalisiert ist. Dieser Prozess wird als *Superaustausch* bezeichnet.

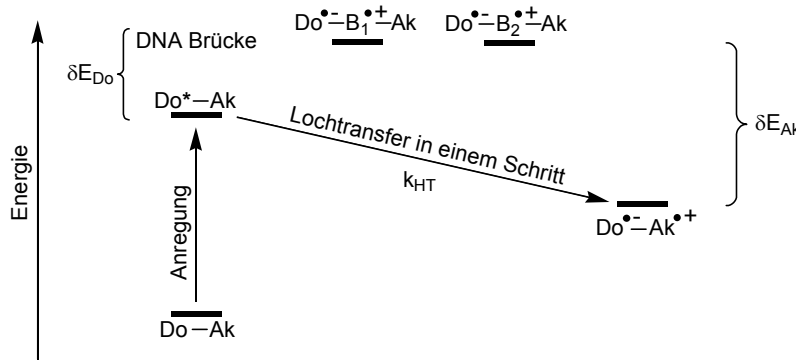


Abb.3-15: Schematische Darstellung des *Superaustausch*-Mechanismus beim oxidativen Lochtransfer. Die Ladung wird vom Donor (Do) zum Akzeptor (Ak) in einem Tunnelprozess übertragen. **B** bezeichnet Nukleobasen des dazwischen liegenden Basenstapels.

Die Rate des Lochtransfers k_{HT} nach dem *Superaustausch* ist exponentiell von der Entfernung R zwischen Donor und Akzeptor abhängig. Sie berechnet sich gemäß *Marcus-Levich-Jortner* nach:^[125]

$$k_{HT} = \frac{2 \cdot \pi}{\hbar} \cdot \frac{V^2}{\sqrt{4 \cdot \pi \cdot \lambda \cdot k_B \cdot T}} \cdot \exp\left(-\frac{(\Delta G_{ET} + \lambda)^2}{4 \cdot \lambda \cdot k_B \cdot T}\right) \quad \text{Gleichung 3-27}$$

Dazu wird die Reorganisationsenergie λ sowie die Triebkraft des Elektronentransfers ΔG_{ET} benötigt. Das Matrixelement der elektronischen Kopplung V^2 verändert sich exponentiell mit dem Abstand R zwischen Donor und Akzeptor, wobei V_0^2 den Maximalwert von V^2 darstellt, während es sich bei β um einen Proportionalitätsfaktor handelt:

$$V^2 = V_0^2 \cdot e^{-\beta \cdot R} \quad \text{Gleichung 3-28}$$

Aus diesen beiden Gleichungen ergibt sich die Abstandsabhängigkeit der Ladungstransferrate k_{HT} :

$$k_{HT} \propto e^{-(\beta \cdot R)}$$

Gleichung 3-29

β ist der kritische Parameter, der die Abstandsabhängigkeit des oxidativen Lochtransfers bestimmt. β ist abhängig von den Eigenschaften der Brücke B und deren Kopplung mit Donor und Akzeptor. Für den oxidativen Lochtransfer in DNA gemäß des *Superaustausch*-Mechanismus sind β -Werte im Bereich von $\beta = 0,6$ - $0,8 \text{ \AA}^{-1}$ charakteristisch.

Tabelle 3-1: Übersicht wichtiger Experimente zum oxidativen Ladungstransfer in DNA.

Ladungsdonor/ Ladungsakzeptor	$\beta [\text{\AA}^{-1}]$	$k_{CT} [\text{s}^{-1}]$	Arbeitsgruppe	Jahr
Ru(II)/ Rh(III) Komplexe	„0,2“ ^[a]	10^9	Barton ^[126-129]	1993
Ru(II)/ Rh(III) Komplexe	1,0 - 1,5	10^6	Meade ^[130]	1995
St/ G	0,64	$10^8 - 10^{12}$	Lewis/Wasielewski ^[116]	1997
Et'/ Rh(III) Komplex	-	10^{10}	Barton ^[131]	1997
Ac/ G	1,4	$10^5 - 10^{10}$	Tanaka ^[132]	1998
Rf/ GG	-	-	Saito ^[133-135]	1998
Et/ Z	-	10^{12}	Barton/Zewail ^[136]	1999
Ap/ G	„0,1“ – 1,0	$10^9 - 10^{10}$	Barton/Zewail ^[137, 138]	1999
AQ/ GG, AQ/ OxoG	-	-	Schuster ^[139]	1999
Ap/ G	0,75	$10^6 - 10^7$	Shafirovich ^[140]	2000
Ap/ G	0,6	$10^9 - 10^{11}$	Barton/Zewail ^[138]	2000
AQ/ GG	-	-	Schuster ^[141]	2000
Ac/ G, Ac/ Z	0,8 – 2,0	$10^7 - 10^{12}$	Michel-Beyerle ^[142]	2001
Py/ G, Ptz/ G	„0,2“ – 0,3	10^4	Majima/Kawai ^[143]	2002
^{CNBP}U/ ^{Ph}G	-	-	Saito ^[144]	2002
Ru(II) Komplex/ Me-In	-	$\geq 10^7$	Barton ^[145]	2002
AQ/ ^{CP}A	-	-	Saito ^[146]	2003
Ap/ G, Ap/ ^{CP}G	-	-	Barton ^[147]	2004
AQ/ GG	-	-	Schuster ^[148]	2004
Rh(III) Komplex/ ^{CP}C, AQ/ ^{CP}C	-	-	Barton ^[149]	2004
St/ Sto	0,4	10^8	Lewis/Wasielewski ^[150]	2004
Sa/ Sd	-	-	Lewis/Fiebig/Shafirovich ^[151]	2006
Et/ Z	0,4	$10^{10} - 10^{11}$	Fiebig/Wagenknecht ^[152]	2006

^[a]Angabe der β -Werte bei Ladungstransfer gemäß des *Hopping*-Modells genaugenommen nicht zulässig, da es sich um einen inkohärenten Prozess handelt, wodurch die *Markus*-Theorie nicht angewandt werden kann. Abkürzungen: **Ac** = Acridin, **Ap** = 2-Aminopurin, **AQ** = Anthrachinon, **^{CP}A** = *N*²-Cyclopropyladenin, **^{CP}C** = *N*²-Cyclopropylcytosin, **DAP** = *N,N'*-Dimethyl-2,7-diazapyren, **Et'** = Ethidium über 5'-Ende mit DNA verknüpft, **Et** = kovalent an DNA gebundenes Ethidium, **G** = Guanin, **^{CP}G** = *N*²-Cyclopropylguanin, **^{Ph}G** = *N*²-Phenylguanosin, **Me-In** = 4-Methylindol, **OxoG** = 7,8-Dihydro-8-oxoguanin, **Ptz** = Phenothiazin, **Py** = Pyren, **Sa** = Stilbendicarboxamid, **Sd** = Stilbendiether, **St** = Stilbendicarboxamid, **Sto** = Stilbenether, **^{CNBP}U** = Cyanobenzophenon-substituiertes Uridin, **Z** = 7-Deazaguanin.

Anhand von Tabelle 3-1, die eine Zusammenfassung wichtiger Studien zum oxidativen Lochtransfer in DNA enthält, wird ersichtlich, dass die experimentell ermittelten β -Werte zwischen $\beta < 0,1 \text{ \AA}^{-1}$ und $\beta = 1,5 \text{ \AA}^{-1}$ liegen. Das Auftreten sehr geringer β -Werte ($\beta < 0,2 \text{ \AA}^{-1}$) in einigen Untersuchungen zum weitreichenden oxidativen Lochtransfer in DNA wies auf eine deutlich geringere Distanzabhängigkeit hin, was dazu führte, dass das Modell vom *Superaustausch* nicht angewandt werden konnte. *Giese et al.* und *Jortner et al.* schlugen als Alternative den *Hopping*-Mechanismus vor (Abb. 3-16).^[153, 154] Im Gegensatz zum *Superaustausch* wird hier die Ladung in mehreren Schritten vom Donor zum Akzeptor transportiert, wobei sie kurzzeitig auf intermediären Ladungsträgern lokalisiert ist. Aufgrund der Oxidationspotentiale der DNA-Basen, die in der Reihe $E_{\text{ox}}(\text{G}/\text{G}^{+\bullet}) < E_{\text{ox}}(\text{A}/\text{A}^{+\bullet}) < E_{\text{ox}}(\text{C}/\text{C}^{+\bullet}) \approx E_{\text{ox}}(\text{T}/\text{T}^{+\bullet})$ zunehmen,^[155, 156] ist das Guaninradikalkation $\text{G}^{+\bullet}$ der wahrscheinlichste intermediäre Ladungsträger. Der entscheidende Faktor in diesem Modell ist nicht der Abstand zwischen Donor und Akzeptor, sondern die Anzahl der dazwischen liegenden *Hopping*-Schritte. Jeder einzelne *Hopping*-Schritt stellt einen stark distanzabhängigen Tunnelprozess von einem intermediären Ladungsträger zum Nächsten dar. *Lewis et al.* konnten die Rate $k_{\text{HOP}(\text{G})}$ für oxidativen Ladungstransfer von einem G auf GG bestimmen. Sie liegt bei $k_{\text{HOP}(\text{G})} = 5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$.^[157]

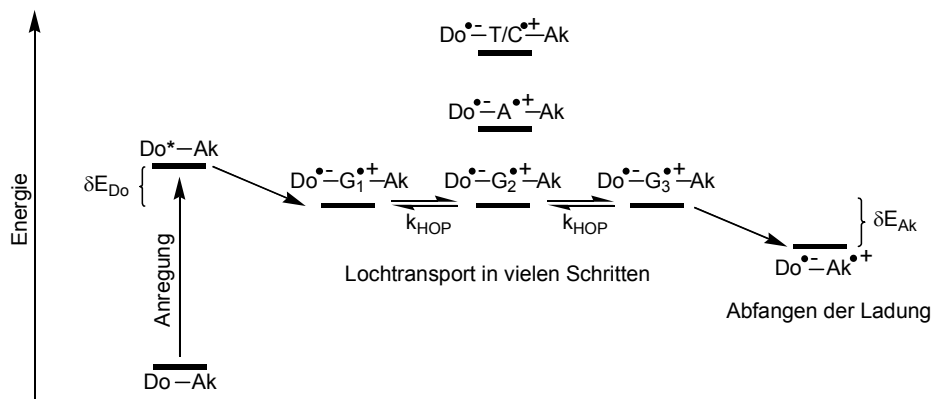


Abb. 3-16: Schematische Darstellung des *G-Hopping*-Mechanismus beim oxidativen Lochtransfer. Die Ladung wird vom Donor (Do) zum Akzeptor (Ak) in mehreren Schritten über intermediäre Ladungsträger ($\text{G}^{+\bullet}$) übertragen.

Verschiedene Arbeitsgruppen, darunter *Barton*,^[145, 147, 158-162] *Saito*^[135, 146], *Giese*^[163-168] und *Schuster*,^[139, 141, 148, 169] zeigten, dass Ladungstransfer auch über längere AT-Sequenzen ($n > 3$) stattfindet, was mit dem *G-Hopping*-Mechanismus nicht erklärt werden kann. Daher wurde angenommen, dass auch Adeninradikalkationen $\text{A}^{+\bullet}$ als intermediäre Ladungsträger

Die Rate für einen *A-Hopping*-Schritt konnte zu $k_{HOP(A)} = 10^{10} \text{ s}^{-1}$ bestimmt werden.^[171] Außerdem fand man heraus, dass die Rate k_{HOP} des *A-Hopping*-Mechanismus nur geringfügig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängig ist.

Bekanntlich können Protonentransferprozesse auf einer ähnlichen Zeitskala ablaufen wie Ladungstransferprozesse und dadurch die Effizienz des Ladungstransfers erheblich beeinträchtigen.^[172] Untersuchungen der Arbeitsgruppen Giese^[173] und Shafirovich^[140, 174-177] liefern deutliche Anhaltspunkte dafür, dass das *G-Hopping* an Protonentransferprozesse gekoppelt ist. Dies wird durch die Ergebnisse von Huber *et al.*^[178] untermauert, die herausfanden, dass der pK_S -Wert des Guaninradikalkations $G^{•+}$ ($pK_S \approx 3,9$) in einem ähnlichen Bereich liegt, wie der der komplementären DNA-Base C ($pK_S \approx 4,5$).^[179] Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass Protonentransferprozesse das *Hopping* über G beeinflussen und möglicherweise sogar unterbrechen können. Der Ladungstransport durch *A-Hopping* wird hingegen nicht durch Protonentransferprozesse beeinträchtigt, da einerseits das Adeninradikalkation $A^{•+}$ eine starke Säure darstellt ($pK_S \leq 1$), Thymin aber andererseits eine sehr niedrige Basizität aufweist ($pK_S(T(H)^+) = -5$).^[179] Daher wird die Ladung effizienter weiter transportiert, was auch die geringe Distanzabhängigkeit des *A-Hoppings* erklärt.^[180, 181] Die Arbeitsgruppe Barton zeigte, dass weitreichender oxidativer Ladungstransport durch DNA auch über Distanzen von mehr als 200 Å möglich ist.^[158]

Zur mechanistischen Beschreibung des weitreichenden oxidativen Ladungstransfers schlugen Schuster *et al.* ein *polaron*-ähnliches *Hopping*-Modell vor.^[141, 169, 182] Dieses Modell basiert auf der Annahme, dass die Oxidation einer Base innerhalb einer bestimmten DNA-Sequenz mit einer strukturellen Veränderung einhergeht, die die Energie des Systems verringert. Demzufolge wird das Radikalkation durch eine Orientierungsänderung benachbarter Basen, die zu einer Delokalisierung der Ladung über mehrere Basen führt, stabilisiert. Der Ladungstransfer in DNA erfolgt so lange, bis das Radikalkation durch Delokalisierung so gut stabilisiert wird, dass die Energie für einen weiteren *Hopping*-Schritt nicht mehr ausreicht.

Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe Barton zeigen, dass die Flexibilität und Dynamik der DNA in den Modellen berücksichtigt werden muss, da Ladungstransfer über längere Distanzen nur auf einer Zeitskala möglich ist, in der sich auch die Bewegungen der Nukleobasen im Basenstapel vollziehen.^[136] Man nimmt an, dass die Voraussetzung für einen effizienten Ladungstransfer in DNA eine optimale Überlappung der zwischen Donor und Akzeptor liegenden Orbitale ist. Dieser Vorgang wird als „*base gating*“^[136, 147, 160, 183] bezeichnet und gilt sowohl für den oxidativen als auch für den reduktiven Ladungstransfer.

Die Art des Ladungstransfers durch DNA kann nicht als intrinsische Eigenschaft eines Donor-Akzeptor-Systems aufgefasst werden. Vielmehr scheint es, dass Ladungstransfer über kurze Distanzen in den meisten Systemen nach dem *Superaustausch*-Prinzip, weitreichender Ladungstransfer jedoch nach dem *Hopping*-Mechanismus verläuft.^[151]

3.3.3. Reduktiver Elektronentransfer

Die Erforschung des reduktiven Elektronentransfers begann erst einige Jahre später und wurde zunächst nur von wenigen Arbeitsgruppen betrieben.^[126] In den letzten 10 Jahren wurden die Bemühungen intensiviert und die Untersuchung des reduktiven Ladungstransfers vorangetrieben.

Der reduktive Elektronentransport durch die DNA-Helix benötigt einen Ladungsdonor zur Injektion des Elektrons, sowie einen Ladungsakzeptor mit einem geeigneten Reduktionspotential zum Abfangen des Elektrons. Zu Beginn wurden die Mechanismen des oxidativen Lochtransfers auf die Wanderung des Überschusselektrons im reduktiven Ladungstransfer übertragen. Dementsprechend wurde auch hier angenommen, dass Elektronentransfer über kurze Distanzen nach dem Superaustausch-Prinzip erfolgt, während der Transfer über weitere Distanzen wahrscheinlich gemäß des *Hopping*-Mechanismus verläuft.^[184] Aufgrund der von *Seidel et al.* veröffentlichten Reduktionspotentiale der Nukleobasen in der Reihenfolge $E_{\text{red}}(\text{T}/\text{T}^{\bullet-}) \approx E_{\text{red}}(\text{dU}/\text{dU}^{\bullet-}) \approx E_{\text{red}}(\text{C}/\text{C}^{\bullet-}) < E_{\text{red}}(\text{A}/\text{A}^{\bullet-}) < E_{\text{red}}(\text{G}/\text{G}^{\bullet-})$ ^[155] wurde angenommen, dass beide Pyrimidinradikalanionen $\text{T}^{\bullet-}$ und $\text{C}^{\bullet-}$ als intermediäre Ladungsträger fungieren.^[184] Nach *Steenken* weisen $\text{T}^{\bullet-}$ und $\text{C}^{\bullet-}$ jedoch stark unterschiedliche Basizitäten auf, wobei $\text{C}^{\bullet-}$ mit einem $\text{pK}_{\text{A}}(\text{C}(\text{H})^{\bullet-}) \geq 13$ deutlich basischer ist als $\text{T}^{\bullet-}$ ($\text{pK}_{\text{A}}(\text{T}(\text{H})^{\bullet-}) = 6,9$).^[179, 185] Spätere Arbeiten der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* zeigten, dass der Protonentransfer den Elektronentransfer stark beeinflusst, was darauf schließen lässt, dass $\text{T}^{\bullet-}$ gegenüber $\text{C}^{\bullet-}$ eine größere Bedeutung als Elektronenüberträger hat.^[178, 186-188]

Zur Erforschung von Elektroneninjektion und reduktivem Elektronentransfer wurden bereits Flavin (**Fl**),^[189, 190] Naphthalindiamin (**Nd**),^[191, 192] Stilbendiether (**SbE**),^[118] das Thyminderivat **Tx**^[193, 194], das Phenothiazinderivat **Pz**,^[195] Phenothiazin-dU (**PzdU**)^[188], Aminopyren (**Apy**),^[196, 197] die pyrenmodifizierten Uridine **1PydU**^[186, 198], **2PydU**^[199, 200] und **PedU**^[201], Thiazol Orange (**TO**)^[202] und Ethidium (**Et**)^[28, 30] als photoanregbare Elektronendonoren kovalent an Oligonukleotide gebunden. Die Redox Eigenschaften dieser Chromophore unterscheiden sich sehr deutlich, wie Abb. 3-19 zeigt.

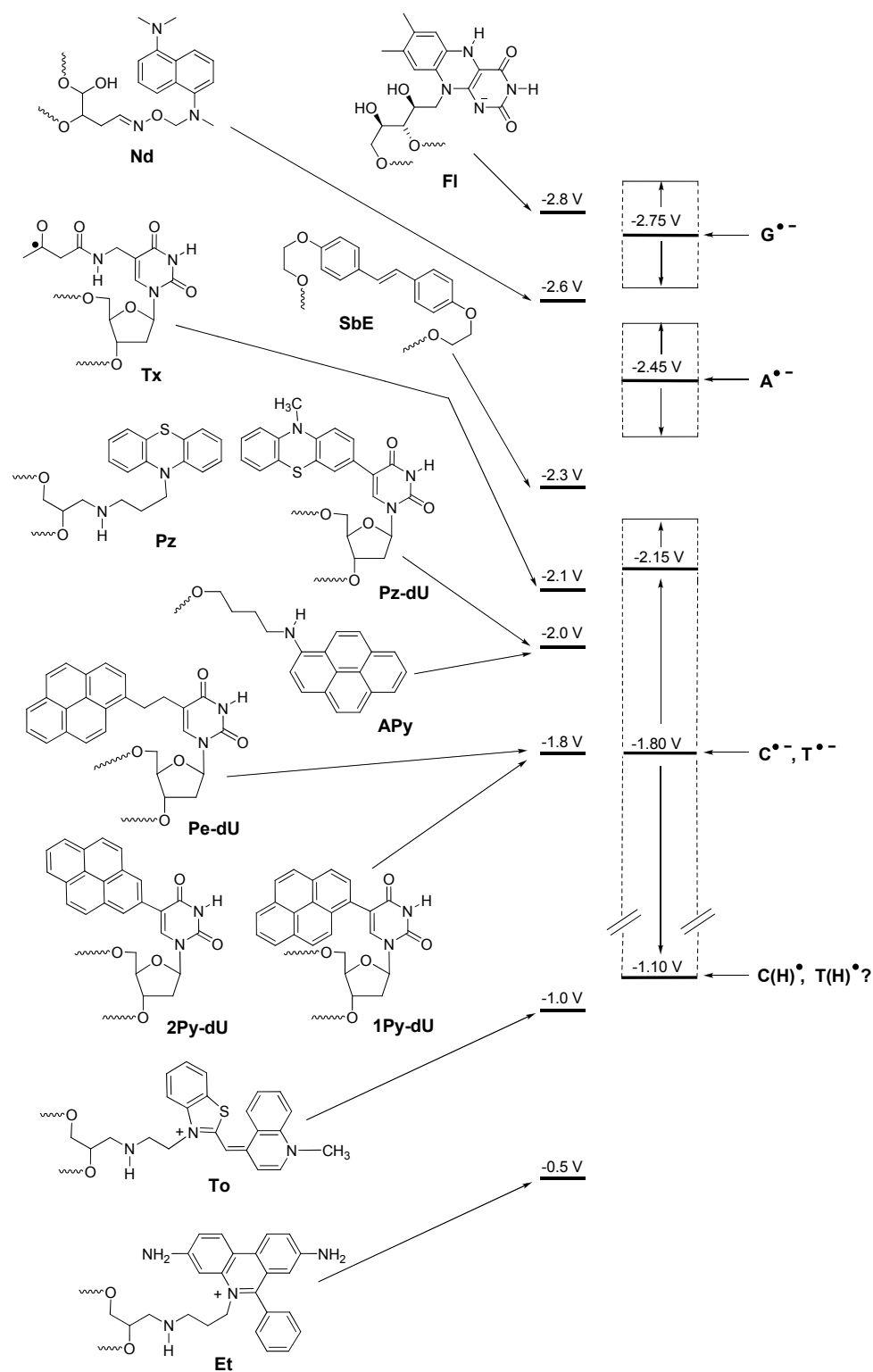


Abb. 3-19: Übersicht verschiedener Ladungsinjektoren zur Auslösung des reduktiven Elektronentransfers in DNA.

Der Nachweis des erfolgreichen Elektronentransfers durch DNA kann sowohl durch ESR-^[203-207] und zeitaufgelöste Fluoreszenzmessungen, als auch auf chemischem Wege geschehen. Dazu wird ein artifiziereller Baustein in die DNA-Sequenz inkorporiert, dessen

Radikalanion eine Veränderung des DNA-Stranges bewirkt. Wird das Oligonukleotid in zwei Fragmente gespalten, können die entstehenden Bruchstücke bzw. die Menge des verbleibenden intakten DNA-Stranges anschließend durch HPLC^[189], Gelelektrophorese^[191, 192] oder Kapillarelektrophorese^[208] analysiert werden.

Die Arbeitsgruppe *Carell* verwendete als Elektronendonator das reduzierte und deprotonierte Flavinderivat **Fl**, das im angeregten Zustand ein Reduktionspotential zwischen -2,6 V und -2,8 V besitzt und damit in der Lage ist, alle natürlichen Nukleobasen zu reduzieren.^[209, 210] Zur Detektion des photochemisch induzierten Elektronentransfers durch den DNA-Duplex wurde ein Thymindimer (**T⁺T**) benutzt, das dem in der menschlichen Zelle als Photoschaden bekanntem Thymidindimer gleicht. Die Cycloreversion des Vierrings nach Aufnahme eines Elektrons führt somit zur Entstehung zweier kurzer DNA-Bruchstücke, die mittels RP-HPLC detektiert wurden. Die Spaltung des Thymindimers verläuft vergleichsweise langsam ($k \approx 10^6 \text{ s}^{-1}$) und nahezu unabhängig von der Distanz zum Donor, von der DNA-Sequenz und von der Richtung des Elektronentransfers. Diese Resultate deuten auf einen Elektronentransport gemäß des *Hopping*-Mechanismus hin.^[211, 212]

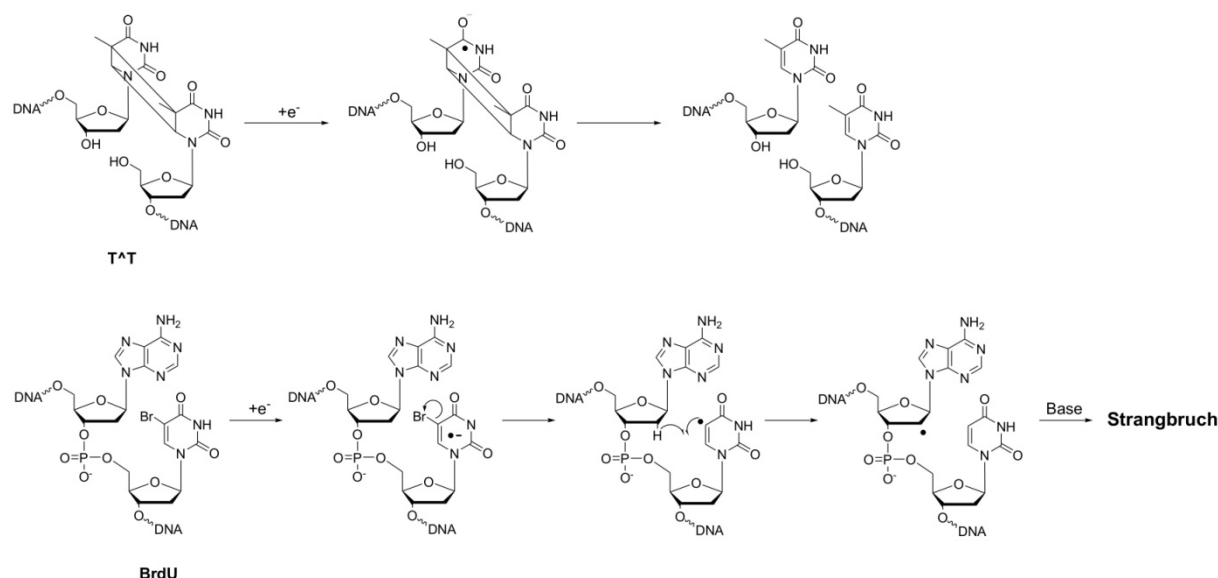


Abb. 3-20: Schematische Darstellung der durch Elektronenübertragung induzierten Strangbrüche mit **T⁺T** (oben) und BrdU (unten) als Akzeptoren. Die Wasserstoffabstraktion kann im Falle von BrdU auch an der C1'-Position erfolgen.^[213, 214]

Giese und *Carell* konnten zeigen, dass die Spaltungsreaktion eines Thymindimers unter „Katalyse“ eines Elektrons stattfindet.^[194] Das Überschusselektron verbleibt in einem der beiden entstehenden DNA-Stränge und ist in der Lage, mehr als ein Thymindimer im gleichen DNA-Strang zu spalten. Für diese Experimente verwendeten *Giese et al.* als Ladungsdonor

das Thyminderivat **Tx**, das durch photochemische Spaltung des *tert*-Butylketonrests nach *Norrish* in ein Ketylradikal mit einem Redoxpotential von -2.1 V überführt wird. Das überschüssige Elektron wird anschließend auf Thymin übertragen.^[193, 194] Dieses System ist im Gegensatz zu Naphtalendiamiden und Flavinen, nur zur Injektion eines Elektrons in der Lage, ein Rückelektronentransfer zum Injektor ist hier nicht möglich.

Die Arbeitsgruppe *Rokita*^[191, 192, 215] setzte Naphthalindiamid **Nd** als artifizielle Nukleobase ein. Dessen angeregter Zustand besitzt ein Reduktionspotential von -2.6 V und ist daher nicht mehr zur Reduktion von Guanin fähig, ermöglicht aber die Übertragung von Elektronen auf die verbleibenden drei natürlichen Nukleobasen. Als Ladungsfalle wurde 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) verwendet, von dem nach Aufnahme eines Elektrons ein Bromidion abgespalten wird (vgl. Abb. 3-20).^[191, 192] Das zurückbleibende neutrale Uridinradikal geht Folgereaktionen ein, deren Produkte bei Zugabe einer Base (z. B. Piperidin) einen Strangbruch erzeugen. Gleichzeitig wird mit dem Austritt des Bromidanions das überschüssige Elektron aus der DNA entfernt. Daher kann im Gegensatz zum Thymindimer keine weitere Spaltungsreaktion auftreten. Man vermutet, dass BrdU ein Reduktionspotential vergleichbar dem unmodifizierter Pyrimidinbasen besitzt und damit eine kinetische, keine thermodynamische Elektronenfalle darstellt.^[186, 188]

Das System aus Naphthalindiamid und BrdU weist eine deutliche Distanz-, Sequenz- und Elektronentransferrichtungsabhängigkeit auf, typische Merkmale eines *Superaustausch*-Mechanismus. Verglichen mit dem Thymindimer zeigt BrdU eine wesentlich schnellere Reaktionszeit ($k \approx 10^{10} \text{ s}^{-1}$), wodurch eine detaillierte Untersuchung sehr schneller Elektronentransferprozesse ermöglicht wird.^[216]

Im Wesentlichen kann der reduktive Elektronentransfer in DNA, ebenso wie der oxidative Lochtransfer, mit Hilfe des *Superaustausch*- und des *Hopping*-Mechanismus beschrieben werden, was durch die bisherigen Studien zum reduktiven Elektronentransfer, die in Tabelle 3-2 zusammengefasst sind, gezeigt wird.

Wie bereits erwähnt, sind für den reduktiven Ladungstransfer keine Folgeschäden in der DNA unter natürlichen Bedingungen bekannt. Die Anwendungsmöglichkeiten dieses Prozesses liegen vor allem in der DNA-Chiptechnologie und Nanotechnologie.^[18, 217-224]

Tabelle 3-2: Übersicht einiger wichtiger Experimente zum reduktiven Ladungstransfer in DNA

Ladungsdonor/ Ladungsakzeptor	β [\AA^{-1}]	Arbeitsgruppe	Jahr
E/ V	-	<i>Fromherz</i> ^[225]	1986
E/ V, Ac/ DAP	1,0	<i>Harriman</i> ^[226]	1992
Ru(II)/ Rh(III)-Komplexe	\leq „0,2“ ^[a]	<i>Barton</i> ^[126]	1993
Py/ V	-	<i>Shafirovich</i> ^[227]	1997
St/ G	0,64	<i>Lewis</i> ^[116, 118, 228, 229]	1997
SbE/ C, T, BrdU	-	<i>Lewis</i> ^[117, 230-232]	1999
e_{aq.}/ Nc, e_{aq.}/ Nq	-	<i>Anderson</i> ^[233]	1999
e_{aq.}/ Mx	0,9	<i>Sevilla</i> ^[203-206, 234]	2000
Fl/ T⁺T	„0,1“	<i>Carell</i> ^[189, 235, 236]	2000
Py-dU/ C, T	-	<i>Wagenknecht</i> ^[187, 198]	2002
Nd/ BrdU	0,3	<i>Rokita</i> ^[191, 192, 215, 237]	2003
Tx/ T⁺T	-	<i>Giese/ Carell</i> ^[194]	2004
PtzdU/ BrdU	-	<i>Wagenknecht</i> ^[188, 195]	2005
PedU/ BrdU	-	<i>Netzel</i> ^[201]	2005
PydU/ BrdU	-	<i>Wagenknecht</i> ^[186]	2005
Et/ Ni	0,32	<i>Wagenknecht</i> ^[30]	2006
Ptz/ Tg	-	<i>Ito/ Nishimoto</i> ^[238]	2006
Fl/ BrdU, BrdA, BrdG	-	<i>Carell</i> ^[208]	2006
Fl/ OxT, OxdU	-	<i>Carell</i> ^[239]	2006
Ir(III)-Komplex/ ^{CP}C	-	<i>Barton</i> ^[240]	2007
To/ Ni	-	<i>Wagenknecht</i> ^[202]	2008
Apy/ BrdU, Apy/ IdU	-	<i>Fiebig/ Lewis</i> ^[196]	2009

^[a]Angabe der β -Werte bei Ladungstransfer gemäß des *Hopping*-Modells genaugenommen nicht zulässig, da es sich um einen inkoherenten Prozess handelt, wodurch die *Markus*-Theorie nicht angewandt werden kann. Abkürzungen: **Ac** = Acridin, **Apy** = Aminopyren, **BrdA** = Brom-dA, **BrdG** = Brom-dG, **BrdU** = Brom-dU, **^{CP}C** = *N*²-Cyclopropylcytosin, **DAP** = *N,N'*-Dimethyl-2,7-diazapyren, **E** = Ethidium, **Et** = kovalent an DNA gebundenes Ethidium, **e_{aq.}** = solvatisierte Elektronen (aus wässrigen Lösungsmitteln durch γ -Bestrahlung), **Fl** = Flavin, **IdU** = Iod-dU, **Mx** = Mitoxantron, **Nc** = Nitroacridin, **Nd** = Naphthalindiamid, **Ni** = 5-Nitroindol, **Nq** = Nitrochinolin, **OxdU** = Thyminoxetan-dU, **OxT** = Methylthyminoxetan, **PedU** = Perylen-dU, **Ptz** = Phenothiazin, **Py** = Pyren, **PydU** = Pyren-dU, **PtzdU** = Phenothiazin-dU, **Sbe** = Stilbendiether, **St** = Stilbendicarboxamid, **Tg** = Thymindiol, **To** = Thiazol Orange, **Tx** = Dialkylketonmodifiziertes Thymin, **T⁺T** = Thymindimer **V** = Methylviologen.

3.4. Biologische Relevanz von Ladungstransferreaktionen in DNA

Viele Schäden am Erbgut entstehen durch das Auftreten radikalischer Ladung in der DNA. Diese Radikale können durch verschiedene Faktoren erzeugt werden, z. B. Bestrahlung (Röntgen, UV), Sauerstoff- und organische Radikale, sowie Alkylierungsreagenzien.^[91] Ein wichtiges Intermediat bei radikalischen DNA-Schädigungen ist das Guaninradikalkation G^{++} , das durch Reaktion mit Molekülen in seiner Umgebung (z. B. H_2O , O_2) zur Bildung von

oxidativen Guaninschäden (G^{ox}) führt.^[241, 242] Viele Oxidationsprodukte des Guanins konnten identifiziert werden und einige wichtige sind in Abb. 3-21 zusammengefasst.

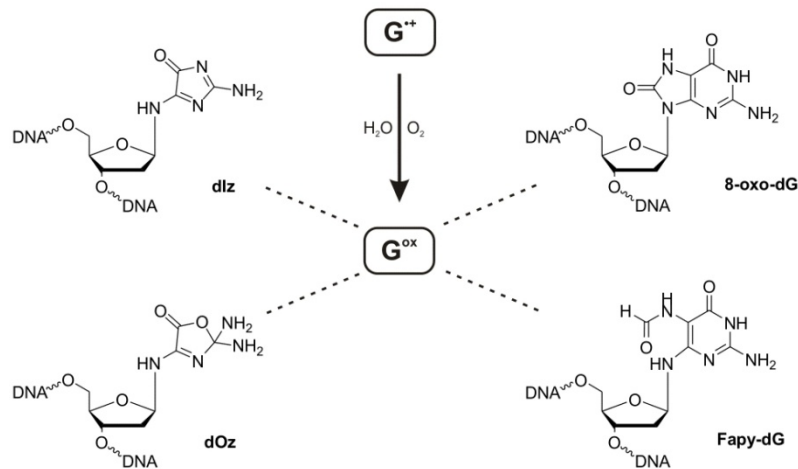


Abb. 3-21: Übersicht wichtiger Oxidationsprodukte des Guanins (G^{ox}). Erläuterungen: Fapy-dG: 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin, 8-oxo-dG: 8-Oxo-7,8-dihydroguanin, dOz: Oxazol, dlz: Imidazol.^[241-243]

Als Beispiel für die mutagene Wirkung von oxidiertem Guanin soll hier 8-oxo-dG erläutert werden,^[92] durch dessen Bildung sich das Konformerengleichgewicht verschiebt. Es entsteht ein Gemisch aus *anti*- und *syn*-ständigem 8-oxo-dG. Wird 8-oxo-dG vor der Replikation als fehlerhafte Base erkannt und von Reparaturenzymen beseitigt, ergeben sich keinerlei Folgen für den Organismus. Auch das Vorliegen von 8-oxo-dG in der *anti*-Konformation bleibt folgenlos, da die *Watson-Crick*-Basenpaarung erhalten bleibt und bei der Replikation durch die DNA-Polymerase ein C gegenüber 8-oxo-dG eingebaut wird. Kommt es allerdings zu einer Konformationsänderung in die *syn*-Form, wird aufgrund der *Hoogsteen*-Basenpaarung mit A bei der Replikation ein A gegenüber von 8-oxo-dG eingebaut. Wird bei der anschließenden Reparatur 8-oxo-dG als fehlerhafte Base gegenüber A erkannt, wird es durch Nukleotidexzession entfernt und stattdessen T als komplementäre Base zu A eingebaut. Damit ist die Mutation abgeschlossen, in der das ursprüngliche GC-Paar durch ein AT-Paar ausgetauscht wurde (vgl. Abb. 3-22).

Carell et al. konnten diese Mutation mittels Kristallstrukturen der einzelnen Replikationsschritte von oxidativ geschädigter DNA eindeutig nachweisen.^[244] In ihren Untersuchungen zeigte sich, dass das mutagene *Hoogsteen*-Paar bestehend aus 8-oxo-dG und A während der Replikation ein intaktes TA-Paar imitiert.

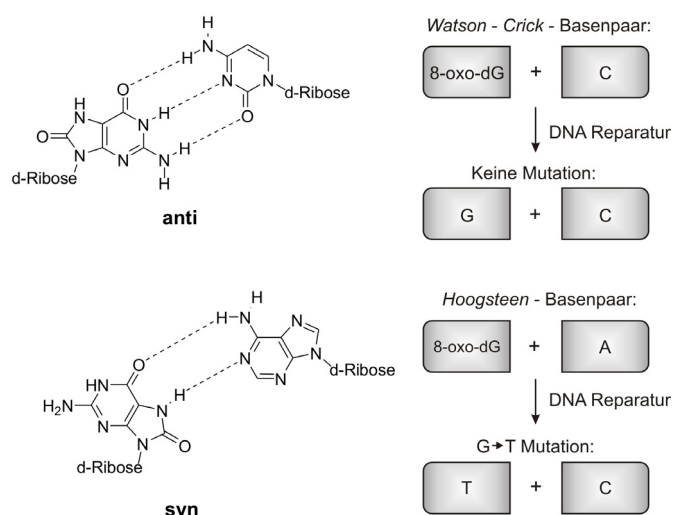


Abb. 3-22: Schematische Darstellung einer durch G-Oxidation ausgelösten Mutation von -GC- nach -TA-.

Kürzlich zeigte die Arbeitsgruppe *Barton*, dass reduktiver Elektronentransfer durch DNA eine Oxidation des DNA-gebundenen Basenexzisions-Reparaturenzyms *MutY* bewirkt,^[93-95] welches Fehlpaarungen von Adenin mit 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxo-dG, vgl. Abb. 3-21) oder Guanin korrigiert.^[245] *MutY* beinhaltet, wenn es ungebunden in der Zelle vorliegt, redoxinaktive $[4Fe4S]^{2+}$ -Cluster. Durch Bindung an die DNA ändert sich das Redoxpotential so, dass der Cluster unter Abgabe eines Elektrons in den DNA-Basenstapel zu $[4Fe4S]^{3+}$ oxidiert werden kann. Daher wird vermutet, dass Ladungstransportprozesse durch DNA eine Aktivierung der Reparaturenzyme bewirken. Der induzierte reduktive Elektronentransfer kann zur Reduktion eines weiteren gebundenen Enzyms genutzt werden, das anschließend aufgrund geringerer Affinität von der DNA abdissoziiert. Im beschädigten DNA-Duplex wird der reduktive Elektronentransfer unterbrochen, wodurch das Enzym an der DNA gebunden bleibt. Dadurch kann die Sequenz nach fehlerhaften Basenpaarungen abgefragt und Reparaturmechanismen eingeleitet werden.

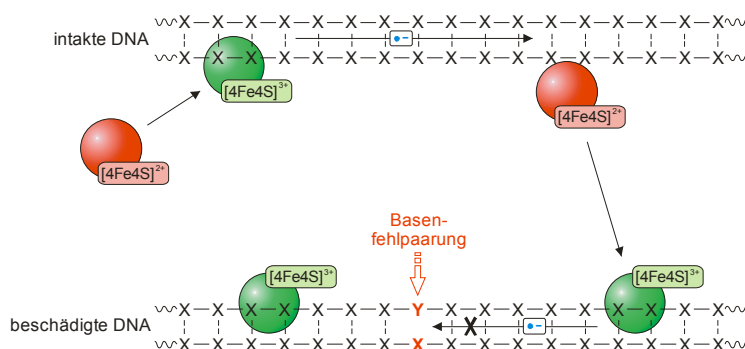


Abb. 3-23: Schematische Darstellung der reduktiven Elektronentransferprozesse zwischen zwei DNA-bindenden Proteinen in der Basenexzisions-Reparatur durch *MutY*.

3.5. Ethidium als biochemische Sonde für Ladungstransferreaktionen

Die intensiv violett gefärbte Verbindung 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid, manchmal auch als Homidiumbromid bezeichnet, ist unter dem Handelsnamen Ethidiumbromid (**E**) bekannt geworden. Die Substanz und erste Derivate wurden bereits 1930 synthetisiert, in den 1950er Jahren begann die Nutzung verschiedener Derivate als Medikament gegen Trypanosomis in der Tiermedizin.^[246, 247] 1963 erkannte *Elliot*, dass Ethidiumbromid an DNA binden kann.^[248] Detaillierte Untersuchungen von *Waring* ergaben, dass die zur Verfügung stehenden Bindungsplätze abgesättigt sind, sobald ein Molekül Ethidiumbromid pro 4-5 Nukleotide gebunden wurde.^[249] Später fand man heraus, dass es an vorgeschädigte („*bulged*“) DNA deutlich besser bindet als an intakte DNA.^[250] *Schuster et al.* konnten zeigen, dass photoangeregtes Ethidiumbromid in vorgeschädigter DNA irreversible Schäden hervorruft, die von DNA-Reparaturenzymen oft nicht mehr erkannt werden.^[251] Seit 1972 wird Ethidiumbromid aufgrund seines starken Fluoreszenzanstiegs bei Interkalation in DNA in der Biologie und Biochemie als Anfärbereagenz für DNA nach der Gelelektrophorese angewandt.^[252]

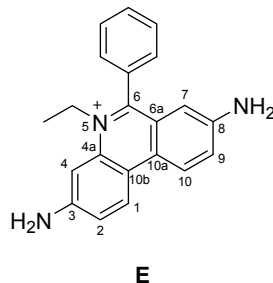


Abb. 3-24: Struktur von Ethidiumbromid (**E**).

1975 präsentierte die Arbeitsgruppe *Sobell* die erste und bisher einzige Kristallstruktur von interkaliertem Ethidiumbromid.^[53-55] Sie kokristallisierten dazu Ethidiumbromid mit den selbstkomplementären Dinukleotiden 5-Iodocytidylyl(3'-5')Guanosin oder 5-Iodouridylyl(3'-5')Adenosine. Die Einzelzelle des entstehenden Komplexes besteht aus zwei Molekülen Ethidiumbromid und zwei Dinukleotiden, die über Watson-Crick-Basenpaarungen einen Duplex bilden (Vgl. Abb. 3-25). Ein Ethidiumbromid-Molekül befindet sich interkaliert in den Miniduplex während das zweite Ethidium-Molekül von außen über π - π -Stacking an zwei DNA-Basen gebunden ist. Man erkennt deutlich, dass sowohl der Phenylring an Position 6 des Phenanthridinium-Grundgerüsts, als auch der Ethylrest an Position 5 in Richtung der kleinen Furche dieses Miniduplexes ragen und offenbar keine Wechselwirkung mit den DNA-

Basen eingehen. Außerdem ragen die Aminogruppen an Position 3 und 8 aus dem Duplex in Richtung des Zucker-Phosphat-Rückgrats. Aufgrund der gemessenen Abstände (ca. 3,5 Å) scheint es möglich, dass die Aminogruppen schwache elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen mit dem O-5' Phosphodiester-Sauerstoff eingehen. Das zweite Ethidium-Molekül ist im Vergleich zum interkalierten Ethidium um 180° gedreht, sodass der Phenyl- und der Ethylrest in die genau entgegengesetzte Richtung zeigen.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Ergebnisse der Ethidium-Dinukleotid-Strukturen nicht uneingeschränkt auf interkaliertes Ethidiumbromid in längeren DNA-Duplexen übertragen werden kann. Trotzdem wird diese Kristallstruktur bis heute als Modell zur Beschreibung der Interkalation von Ethidiumbromid in DNA verwendet.

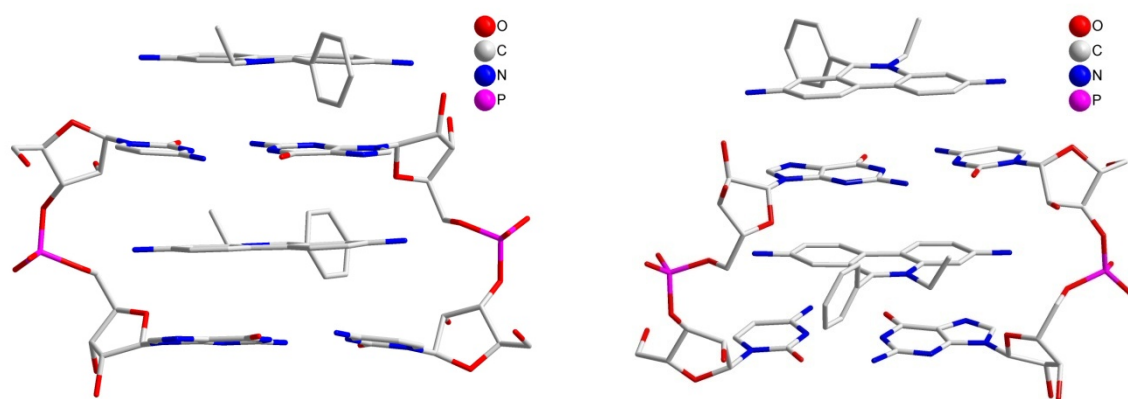


Abb. 3-25: Kristallstruktur eines Ethidium-Dinukleotid-Komplexes.^[53-55]

Die Fluoreszenzintensität des Ethidiumchromophors steigt bei Interkalation in DNA stark an. *Le Pecq* und *Paoletti* begründeten diesen Effekt 1967 damit, dass interkaliertes Ethidium durch die hydrophobe Umgebung der DNA von wässrigem Lösungsmittel, das Fluoreszenzlöschung verursachen würde, abgeschirmt wird.^[253] *Burns* hingegen vermutete, dass der Fluoreszenzanstieg durch eine Konformationsänderung des Farbstoffs bei der Interkalation auftritt. Dadurch würden verbotene Übergänge teilweise erlaubt, was zu einer Erhöhung der Emission führt.^[254] *Hudson* und *Jacobs* schlugen ein Modell vor, bei dem der Triplett-Zustand mit dem angeregten Singulett-Zustand energetisch entartet sei.^[255] Die durch die Umgebung induzierte Vergrößerung der Energielücke würde in einer geringeren *Intersystem-Crossing*-Rate resultieren, was wiederum eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zur Folge hätte. *Olmsted* und *Kearns* untersuchten den Einfluss einiger Lösungsmittel auf die Fluoreszenz des Ethidiums.^[256] Sie zeigten, dass die Fluoreszenzintensität und -lebenszeit von Ethidium in unpolaren Lösungsmitteln deutlich höher ist als in polaren Lösungsmitteln. Auch in deuterierten Lösungsmitteln stieg sowohl die Fluoreszenzlebenszeit als auch die Emission an.

Aufgrund ihrer Ergebnisse schlugen sie einen Protonentransfer-Mechanismus vor (vgl. Abb. 3-26).^[256]

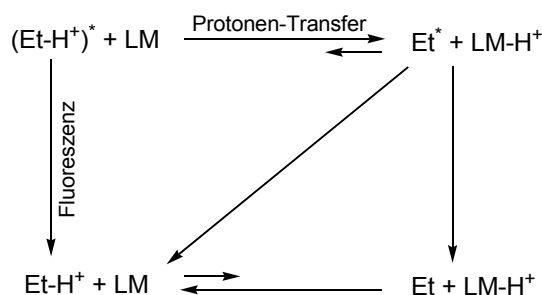


Abb. 3-26: Postulierter Protonentransfer-Mechanismus von *Olmsted* und *Kearns*.^[256] Erläuterungen: $\text{Et-H}^+ / (\text{Et-H}^+)^*$: Grundzustand/angeregter Zustand des Ethidiumbromids, Et / Et^* : Grundzustand/angeregter Zustand des deprotonierten Ethidiumbromids, LM: Lösungsmittel.

Die geringe Emissionsintensität des freien Ethidiumbromids in Wasser führten sie darauf zurück, dass im angeregten Zustand ein Protonentransfer auf das Wasser stattfindet. Die hydrophobe DNA-Umgebung nach der Interkalation verringert den Protonentransfer, was sich in einer steigenden Fluoreszenz widerspiegelt. Vollständig geklärt wird anhand dieses Modells allerdings nicht, warum die Aminogruppen, die offensichtlich am Protonentransfer beteiligt sind, bei Interkalation in DNA besser vom Wasser abgeschirmt sein sollen, obwohl sie aus dem Duplex in Richtung Zucker-Phosphat-Rückgrat ragen.

Trotz intensiver Untersuchungen sind die Gründe für die Intensitätserhöhung der Ethidium-Fluoreszenz bei Interkalation in DNA immer noch nicht komplett verstanden. Die bisher vorgeschlagenen Modelle liefern Erklärungsansätze, alle gefundenen Resultate sind jedoch mit keinem dieser Modelle vollständig vereinbar. Daher ist die Suche nach den Ursachen für die Intensitätserhöhung immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung und dieser Arbeit.

In Fluoreszenz-Assays mit Nukleinsäuren wurden Ethidiumbromid oder dessen Derivate, die im Folgenden als Ethidium bezeichnet werden, oft als nicht kovalent gebundene Interkalatoren verwendet.^[257-260] Um allerdings Ladungstransfer in DNA detailliert untersuchen zu können, muss der Ethidiumchromophor kovalent in die DNA eingebaut werden, damit er an einer genau definierten Position in den Basenstapel interkaliert und somit die Entfernung vom Ladungsakzeptor exakt festgelegt werden kann. Meist erfolgt der Einbau über einen Linker, wodurch Ethidium intern, wie bei *Florentiev et al.*,^[261, 262] oder am 5'-Ende des Oligonukleotids, wie bei *Barton et al.*,^[131, 136] platziert werden kann. Da von *Florentiev et*

al. keine Experimente zum Ladungstransfer durchgeführt wurden, soll im Folgenden nur das Ethidiumsystem von *Barton et al.* genauer erläutert werden.

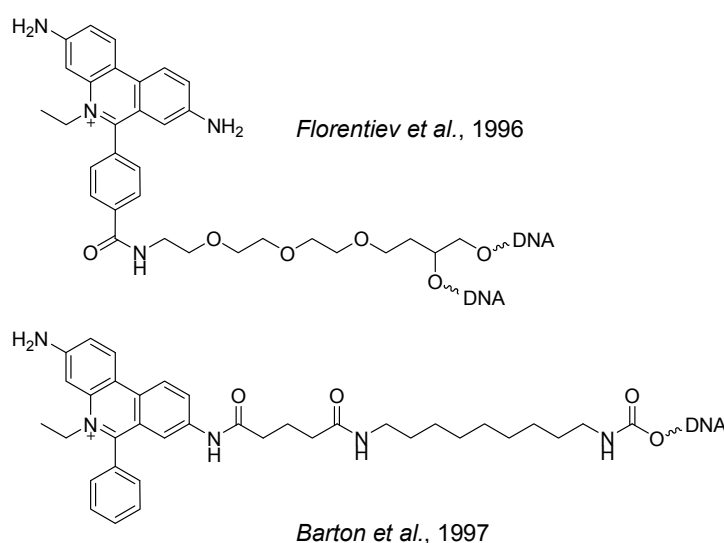


Abb. 3-27: Ethidium-Linker-Systeme, die von *Florentiev et al.*^[261, 262] und *Barton et al.*^[131, 136] an Oligonukleotide geknüpft wurden.

Für ihre Ladungstransferstudien knüpften *Barton et al.* Ethidium über das in Abb. 3-27 gezeigte Linker-System als Ladungsdonor kovalent an das 5'-Ende eines 14mer-Duplex. Als Ladungsakzeptor verwendeten sie 7-Deazaguanin (**Zg**; Struktur vgl. Kapitel 3.7, Abb. 3-37), wodurch sich nach *Rehm-Weller* eine Triebkraft $\Delta G \approx -0,2$ eV für den oxidativen Lochtransfer ergibt. 7-Deazaguanin befand sich im Gegenstrang zwei bis vier Basenpaaren entfernt von Ethidium (vgl. Abb. 3-28).^[136] Durch die flexible Linkeralkylkette bleibt die Beweglichkeit des Ethidiums im Basenstapel erhalten, die Interkalationsstelle ist jedoch nur mit einer Genauigkeit von ± 1 Basenpaar bekannt.



Abb.3-28: Schematische Darstellung der Ladungstransferduplexe von *Barton et al.* mit Ethidium (**Et**; pink) als Ladungsdonor und 7-Deazaguanin (**Zg**; gelb) als Ladungsakzeptor.^[136]

Die Ladungstransferraten, die mittels transientser Absorptionsmessungen bestimmt wurden, waren nur unwesentlich vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor abhängig. Aus den Abklingkurven konnten zwei Zeitkonstanten ermittelt werden: $\tau_I \approx 5$ ps ($k_{CT} \approx 2 \cdot 10^{11}$ s⁻¹) und $\tau_2 \approx 75$ ps ($k_{CT} \approx 1 \cdot 10^{10}$ s⁻¹). Fluoreszenz-Anisotropie-Messungen zeigten, dass die Orientierungsrelaxation von freiem Ethidium in Wasser innerhalb von ca. 70 ps verläuft, die Fluoreszenzlöschung von Ethidium in bimolekularen Komplexen mit 7-Deazaguanin erfolgt im selben Zeitraum.^[263] Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass Ethidium, das trotz Interkalation in den Basenstapel offenbar über bestimmte Freiheitsgrade verfügt, vor der Ladungsübertragung eine Umorientierung erfährt, die ratenlimitierend ist (*base gating*, vgl. Kapitel 3.3.2). Die Lebenszeit $\tau_I \approx 5$ ps wird dabei denjenigen Molekülen zugeschrieben, in denen Ethidium bereits im Grundzustand optimal mit den Nachbarbasen wechselwirkt, wodurch keine Umorientierung für einen effizienten Ladungstransfer erforderlich ist.^[136] Mit Ethidium und 7-Deazaguanin ist ein Donor-Akzeptor-System gelungen, in dem sehr effizienter Ladungstransfer stattfindet, was sich in den Raten im Bereich von $k_{CT} \approx 10^{10}$ s⁻¹ bis $k_{CT} \approx 10^{11}$ s⁻¹ zeigt, die zudem weitgehend unabhängig vom Abstand zwischen Donor und Akzeptor sind.

Valis et al. verwendeten in ihren Untersuchungen zum Ladungstransfer ein Ethidiumbasensurrogat, das über einen wesentlich kürzeren Linker in Oligonukleotide eingebaut wurde (vgl. Abb. 3-29).^[152] Zur Untersuchung des oxidativen Lochtransfers wurde ebenfalls 7-Deazaguanin (**Zg**) als Akzeptor verwendet, entsprechende Experimente zum reduktiven Elektronentransfer wurden mit 5-Nitroindol (**Ni**) als Akzeptor durchgeführt. Sowohl für den oxidativen Lochtransfer zwischen **Et** und **Zg** als auch für den reduktiven Elektronentransfer zwischen **Et** und **Ni** ergibt sich nach *Rehm-Weller* eine Triebkraft von $\Delta G \approx -0,2$ eV. Lag ein Basenpaar zwischen Donor und Akzeptor, so konnte in Einklang mit den Ergebnissen von *Barton et al.* eine Rate von $k_{CT} \approx 1 \cdot 10^{10}$ s⁻¹ für beide Systeme ermittelt werden. Für den **Et-Zg**-Duplex wurde eine Zeitkomponente von $\tau_I \approx 50$ ps, für den **Et-Ni**-Doppelstrang eine Zeitkomponente von $\tau_I \approx 150$ ps bestimmt. In Ladungstransferduplexen mit mehr als einem Basenpaar Abstand zwischen Ethidium und 7-Deazaguanin bzw. 5-Nitroindol konnte hingegen keine Zeitkomponente im ps-Bereich ermittelt werden. Daraus ergibt sich ein drastisches Absinken der Ladungstransferraten über zwei oder mehr dazwischen liegende Basenpaare ($k_{CT} \approx 1 \cdot 10^7$ s⁻¹ bis $k_{CT} \approx 1 \cdot 10^6$ s⁻¹), das sowohl für den oxidativen Lochtransfer als auch für den reduktiven Elektronentransfer beobachtet wurde.^[152] Es wird vermutet, dass die konformelle Flexibilität des Ethidiums durch den Einbau des kurzen, relativ starren Linker-

systems so stark eingeschränkt wird, dass die elektronisch notwendige Umorientierung des photoangeregten Ethidiums kaum bzw. nicht mehr möglich ist. Daher zeigt sich in beiden Donor-Akzeptor-Kombinationen eine deutliche Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers.^[152]

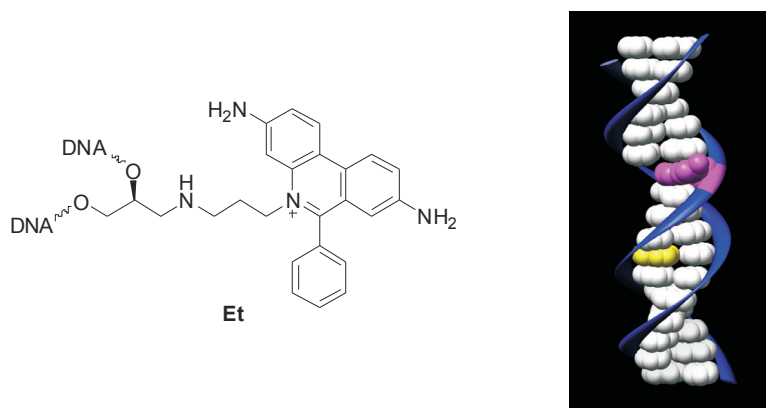


Abb. 3-29: Links: Ethidiumbasensurrogat (**Et**) aus den Experimenten von *Valis et al.* Rechts: schematische Darstellung der Ladungstransferduplexe von *Valis et al.* mit Ethidium (**Et**; pink) als Ladungsdonor und 7-Deazaguanin (**Zg**; gelb) oder 5-Nitroindol (**Ni**; gelb) als Ladungsakzeptor.^[152]

Der Ethidiumbaustein (**Et**) wird in dieser Arbeit als Elektronendonator eingesetzt und daher in Kapitel 5 nochmals genauer vorgestellt.

3.6. DNA-Festphasensynthese und postsynthetische Modifikation von DNA-Strängen

In den 1980er Jahren übertrug *Letsinger*^[97, 264] das von *Merrifield*^[265] entwickelte Prinzip der Peptid-Festphasensynthese auf die Darstellung von Oligonukleotiden. Die Herstellung von DNA nach der sog. Phosphoramiditmethode zählt seither zu den routinemäßig angewandten Verfahren, da auf diese Weise schnell, effizient und zuverlässig Oligonukleotide synthetisiert werden können.^[98, 99]

Die Funktionalisierung von DNA, beispielsweise mit Fluoreszenzfarbstoffen, ist von großer Bedeutung für die molekulare Diagnostik^[21, 22, 266] und bildet die Grundlage für die Konstruktion DNA-basierter funktionaler Nanomaterialien.^[267-269] Die entsprechenden Marker können über die jeweiligen Phosphoramidite bei der Festphasensynthese der Oligonukleotide eingebaut werden. Diese Methode ist allerdings auf Modifikationen beschränkt, die den harschen Bedingungen der DNA-Synthese und -Entschützung standhalten. Alternativ dazu kann die Funktionalisierung auch im Anschluss an die Oligonukleotidherstellung erfolgen, z. B. mittels Pd-katalysierter Kreuzkupplungen^[270] oder durch Amidkupplungen.^[271] Ein

Nachteil dieser Methoden sind jedoch die oftmals geringen Kupplungsausbeuten, welche die Aufreinigung der funktionalisierten Oligonukleotide erschweren.

2002 berichteten die Arbeitsgruppen *Meldal*^[272] und *Sharpless*^[273, 274], dass die von *Huisgen*^[275, 276] entwickelte 1,3-dipolare Cycloaddition von Aziden mit Alkinen effizient durch Kupfer(I) katalysiert werden kann. Diese kupfer-(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC) ist einer der bekanntesten Vertreter der sog. Klickreaktionen, die sich durch sehr hohe Ausbeuten, milde Reaktionsbedingungen, hohe Regioselektivität, die Verträglichkeit mit einer großen Bandbreite funktioneller Gruppen, sowie eine einzigartige Bioorthogonalität auszeichnen, da weder Azide noch terminale Alkine in natürlichen Systemen vorkommen.^[273, 274, 277, 278]

Die Vielfalt der Einsatzmöglichkeiten der CuAAC spiegelt sich in der Anzahl der Veröffentlichungen der letzten Jahre wider, in denen von Modifikationen an Nanopartikeln,^[279, 280] Peptiden,^[281-283] Proteinen,^[284, 285] Polysacchariden,^[286] Viren^[287] und Zellen^[288] berichtet wird. Der Einsatz der CuAAC zur DNA-Modifizierung war zunächst allerdings problematisch, da Kupferionen gewöhnlich DNA-Strangbrüche induzieren und so zu einer Schädigung der DNA führen.^[241, 289] Erst durch Zugabe stark kupfer-(I)-stabilisierenden Liganden (z. B. TBTA)^[290] konnte dieses Problem gelöst werden. Seither konnten verschiedene Arbeitsgruppen, darunter *Seela* und *Sirivolu*,^[291] *Carell*^[267, 277, 292] und *Wagenknecht*,^[293] zeigen, dass die CuAAC zur postsynthetischen Funktionalisierung von DNA sehr gut geeignet ist.^[294]

Zur Modifizierung von Oligonukleotiden mittels CuAAC werden DNA-Stränge benötigt, die Alkine oder Azide als funktionelle Gruppen enthalten. Das Einführen dieser funktionellen Gruppen kann entweder postsynthetisch, z. B. durch Amidkupplung^[295, 296], erfolgen oder durch Einbau entsprechend modifizierter Phosphoramidit-Bausteine während der DNA-Festphasensynthese. Dabei muss beachtet werden, dass azidmodifizierte DNA mittels Standardfestphasensynthese nur schwer zugänglich ist, da Azide durch die Phosphor-(III)-Spezies der Phosphoramidite relativ leicht reduziert werden.^[297]

Alkinmodifizierte DNA hingegen lässt sich bequem mittels Standardfestphasensynthese herstellen. In der Literatur finden sich dafür eine große Anzahl unterschiedlicher alkin-substituierter DNA-Basen oder nicht-nukleosidischer DNA-Bausteine.^[292, 296, 298-303] Einige wichtige sind in Abb. 3-30 dargestellt.

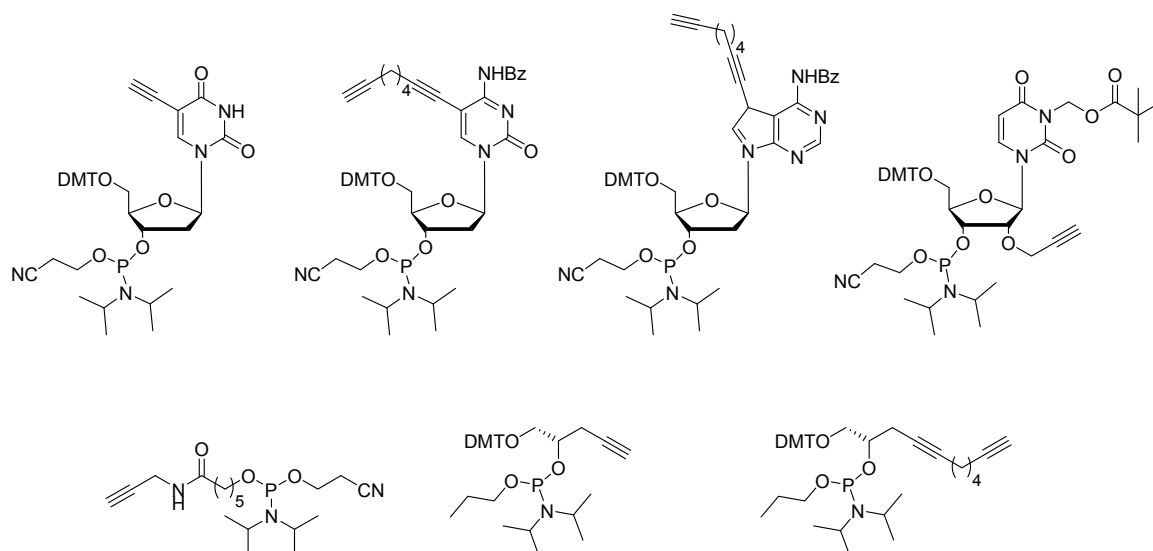


Abb. 3-30: Beispiele für alkylsubstituierte DNA-Basen und nicht-nukleosidische DNA-Bausteine, die zur Herstellung alkylinmodifizierter DNA mittels Standardfestphasensynthese verwendet werden.

Kürzlich zeigte die Arbeitsgruppe *Carell*, dass sich die CuAAC auch zur Modifizierung von Oligonukleotiden mit bis zu drei verschiedenen Markern eignet.^[303] Sie bauten dazu ein freies Alkin, ein TMS-geschütztes Alkin und ein TIPS-geschütztes Alkin mittels Standardfestphasensynthese in ein Oligonukleotid ein und modifizierten es schrittweise nach selektiver Entschützung.

Eine weitere interessante Einsatzmöglichkeit der CuAAC besteht im Nachweis der DNA-Synthese *in vitro* und *in vivo*, wie *Salic et al.* berichteten.^[304] Auch die Herstellung komplexer DNA-Strukturen wird durch CuAAC deutlich erleichtert, wie Arbeiten von *Kumar et al.*^[296] zeigen.

3.7. Detektion von Punktmutationen und das DETEQ-Konzept

Als Punktmutationen (SNP = *single nucleotide polymorphism*) bezeichnet man veränderte Genabschnitte, die sich vom Wildtyp nur in einer einzigen Basenpaarung unterscheiden (vgl. Abb. 3-31).^[20, 21, 305-307] Liegt diese Punktmutation in einer proteincodierenden Region, kann es bei der Translation zu einer Veränderung in der Aminosäuresequenz des zu codierenden Proteins kommen. Eine Mutation in einer Promoterregion führt aufgrund veränderter Proteinexpression zur Änderung des Phänotyps. In Keimzellen können Mutationen zu vererbten Krankheiten führen.

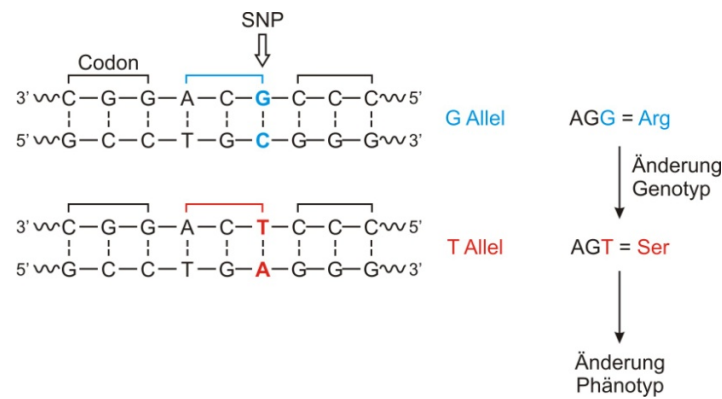


Abb. 3-31: Beispiel für eine Punktmutation: Wildtyp-DNA (oben) und Mutante (unten).

Die SNP-Detektion ist daher für die medizinische und pharmazeutische Diagnostik ebenso wie für die Pharmakogenetik von großer Bedeutung.^[21, 22] Hier erhofft man sich neue Erkenntnisse bezüglich genetisch bedingter Unterschiede, die v. a. Verträglichkeit und Wirksamkeit von Arzneimitteln beeinflussen, um maßgeschneiderte Therapiemethoden für jeden einzelnen Patienten entwickeln zu können.

Ein interessantes Target in der molekularen Diagnostik stellt das p53-Protein dar.^[308] Es fungiert in der Zelle als Tumorsuppressor und sorgt während des Zellzyklus an bestimmten Kontrollpunkten dafür, dass die Proliferation beschädigter Zellen gestoppt und Reparaturmechanismen oder Apoptose eingeleitet werden.^[309] Dadurch wird der Organismus vor der Entstehung von Tumoren geschützt. In ungefähr der Hälfte aller humanen Tumore ist das p53-Protein als Folge einer Mutation im p53-Gen inaktiv.^[309] Abb. 3-32 (unten) zeigt die einzelnen Domänen, die das p53-Protein beinhaltet. Besonders anfällig gegenüber Mutationen ist die DNA-Bindungsdomäne (Abb. 3-32, oben), die für die Aktivierung der Transkription von entscheidender Bedeutung ist. Dort ereignen sich über 95 % der Mutationen, wobei es sich bei 75 % dieser Mutationen um Einzelbasenmutationen handelt.^[308] Innerhalb der DNA-Bindungsdomäne gibt es sechs Codons, die sog. *hot spots*, in denen gehäuft Mutationen auftreten (vgl. Abb. 3-32).^[308]

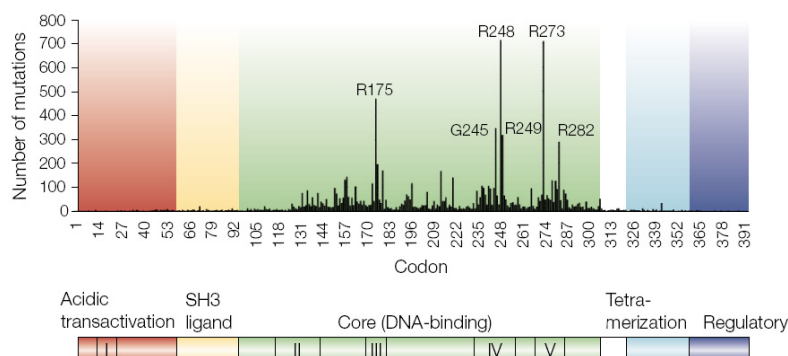


Abb. 3-32: Häufigkeit und Verteilung der kanzerogenen Mutationen in den einzelnen Domänen von p53.^[308]

Dieses Beispiel verdeutlicht die enorme Bedeutung der SNP-Detektion. Es wurden bislang schon einige Methoden zur Erkennung von Punktmutationen entwickelt, die hauptsächlich auf elektrochemischer, massenspezifischer (Quarz-Mikro-Waage (*QCM*)) und optischer Detektion (Fluoreszenz, Oberflächenplasmonresonanz (*SPR*)) beruhen.^[310] Verfahren, die Fluoreszenzsignale zur Detektion von SNPs verwenden, können im Wesentlichen in enzymatische und nicht-enzymatische Systeme unterteilt werden. Wichtige Vertreter der enzymatischen Assays sind u. a. die Einzelnukleotid-Primerverlängerung,^[21, 311] der Invader-Assay^{®[21, 22, 312]} und der TaqMan-Assay^{®[21, 22, 313, 314]}. Einige interessante Strategien zur fluoreszenzbasierten SNP-Detektion in nicht-enzymatischen Systemen werden im Folgenden näher erläutert.

Molecular Beacons ^[314, 315]

Bei den sog. *Molecular Beacons* handelt es sich um Oligonukleotide, die Haarnadelstrukturen ausbilden und an einem Ende mit einem Fluorophor und am anderen Ende mit einem *Quencher* markiert sind (vgl. Abb. 3-33). Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen Fluorophor und *Quencher* kommt es zu einer Löschung der Fluoreszenz durch Energietransfer. Ist die genomische Sequenz komplementär zur Sequenz der *Molecular Beacons*, so ist der entstehende Duplex deutlich stabiler als die Haarnadelstruktur und wird daher bevorzugt gebildet, was einen Fluoreszenzanstieg aufgrund der räumlichen Trennung von Fluorophor und *Quencher* zur Folge hat. Eine Einzelbasenmutation in der Zielsequenz setzt die thermodynamische Stabilität des Duplexes so stark herab, dass die Hybridisierung der *Molecular Beacons* zur Haarnadelstruktur begünstigt wird, wodurch die Fluoreszenz durch Energietransfer weiterhin gelöscht wird.

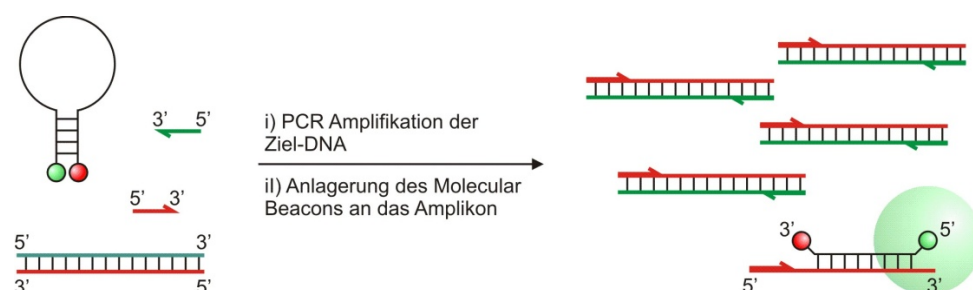


Abb. 3-33: Mechanismus der SNP-Detektion durch Molecular Beacons.^[314]

Basendiskriminierende Fluoreszenzsonden^[314]

Für die meisten bisher genannten Methoden zur Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen werden Oligonukleotidsonden mit zwei Modifikationen (Fluorophor und *Quencher*) benötigt und die Fluoreszenzänderung beruht auf Energietransfer. Alternativ dazu wurden Detektionssysteme entwickelt, die auf Oligonukleotiden mit fluoreszenten DNA-Basen bzw. Basensurrogaten basieren, deren Quantenausbeute sich bei der Hybridisierung ändert. Dazu sind sog. basendiskriminierende Fluoreszenzsonden (BDF, *base-discriminating fluorescence probes*) geeignet, deren Emissionseigenschaften stark von der unmittelbaren elektronischen und strukturellen Umgebung abhängig sind. Derartige BDFs werden anstelle einer natürlichen DNA-Base in den Sondenstrang eingebaut. Nach Hybridisierung mit der Zielsequenz zeigt sich durch Veränderung der Fluoreszenzintensität, ob der Wildtyp oder eine Mutante vorliegt. *Saito et al.*^[316-320] entwickelten fluoreszenzmarkierte DNA-Basen, die in der Lage sind, Basenfehlpaarungen durch verminderte Fluoreszenz anzuzeigen (vgl. Abb. 3-34).

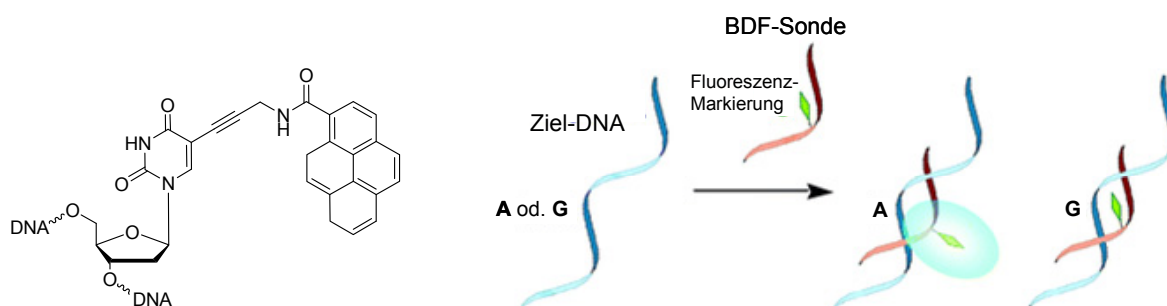


Abb. 3-34: Prinzip der BDFs nach *Saito et al.*^[320] am Beispiel von pyrenmodifiziertem Uridin. Nur für A als Gegenbase zum modifizierten U zeigt sich ein starkes Fluoreszenzsignal.

Der Vorteil dieses Systems ist die leichte Handhabung und die Toleranz weiter pH-Wert- und Salzkonzentrationsbereichen sowie vieler Lösungsmittel. Nachteilig ist allerdings, dass die Fluoreszenz teilweise auch durch die Nachbarbasen C und G gelöscht wird.

Seitz et al. verwendeten Thiazolorange (TO) als artifizielle Base in PNA (*peptide nucleic acid*) (vgl. Abb. 3-35).^[321-326]

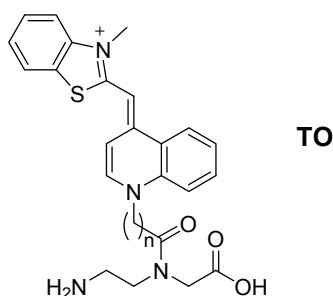


Abb. 3-35: TO-PNA-Baustein von *Seitz et al.*^[321]

Wird ein TO-modifizierter PNA-Strang mit DNA hybridisiert, steigt die Fluoreszenz von TO erheblich an. Bei Basenfehlpaarungen in unmittelbarer Nachbarschaft sinkt die Emissionsintensität bei Raumtemperatur ab. Die Löschung kann durch Erhöhung der Temperatur noch verstärkt werden.

DETEQ-Konzept

In der Arbeitsgruppe *Wagenknecht* wurde das DETEQ-Konzept (*Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching*) zur SNP-Detektion auf der Basis von Ladungstransfer entwickelt (vgl. Abb. 3-36).^[29]

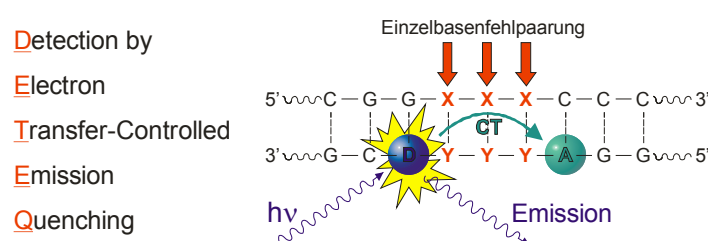


Abb. 3-36: DETEQ-Konzept der Arbeitsgruppe *Wagenknecht*.

Grundlage dieses Konzepts sind Oligonukleotidsonden, die mit einem redoxaktiven Fluorophor und einem geeigneten Ladungsakzeptor versehen wurden. Nach Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz kann es so zu einer Elektronenübertragung durch die DNA-Brücke kommen. Da der Ladungstransfer von der elektronischen Kopplung abhängt, die von der Basenstapelung vermittelt wird, ändert sich die Ladungstransferrate k_{CT} beim Auftreten einer Basenfehlpaarung in der DNA-Brücke zwischen Fluorophor und Ladungsakzeptor. Folglich tritt eine veränderte Fluoreszenz im Vergleich zum Wildtyp auf, was zur Detektion von SNPs genutzt werden kann.

Der entscheidende Vorteil des DETEQ-Konzepts zur SNP-Detektion besteht darin, dass die Fluoreszenzänderungen nicht nur bei direkt benachbarten Basenfehlpaarungen auftreten. Mit einer DETEQ-Sonde sollte es möglich sein, eine Sequenz von zwei oder sogar ein komplettes Codon aus drei Basenpaaren auf Fehlpaarungen abzufragen.

Bei diesem Konzept ist der F_q -Wert als Maß für die Fluoreszenzlöschung der entscheidende Parameter für die zuverlässige Detektion, der mit Hilfe der integrierten Fluoreszenz des fehlgepaarten Duplexes (F_{int}) und des korrekt gepaarten Referenzduplexes (F_{int}^0) bestimmt wird:

$$F_q = 1 - \frac{F_{\text{int}}}{F_{\text{int}}^0}$$

Gleichung 3-30

Die Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen nach dem DETEQ-Konzept ist prinzipiell möglich, wie anhand des Systems PydG-Indol gezeigt wurde.^[199] Das bislang erfolgreichste DETEQ-System besteht aus Ethidium (**Et**) als Ladungsdonor und 7-Deazaguanin (**Zg**) als Ladungsakzeptor, die beide kovalent an DNA gebunden sind (Abb. 3-37). Befindet sich eine Basenfehlpaarung im DNA-Basenstapel zwischen Donor und Akzeptor, wird eine beachtliche Fluoreszenzlöschung von bis zu 90 % erreicht.^[27]

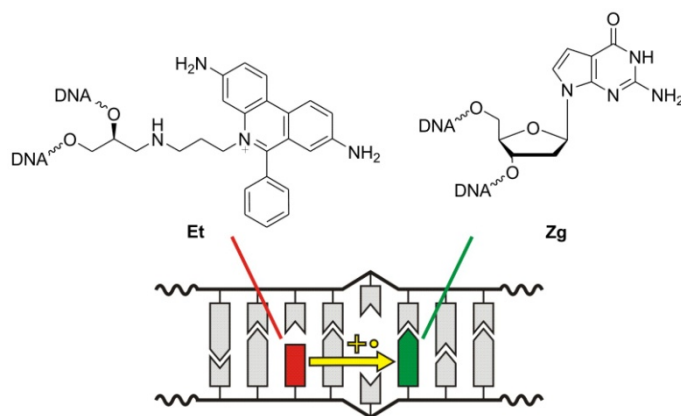


Abb. 3-37: DETEQ-System aus Ethidium (**Et**; links, rot) und 7-Deazaguanin (**Zg**; rechts, grün). Basenfehlpaarungen wurden durch Fluoreszenzlöschung aufgrund eines veränderten Ladungstransfers detektiert.^[27]

Die SNP-Detektion nach dem DETEQ-Konzept wird in dieser Arbeit anhand des Systems Ethidium-Nitroindol untersucht (Kapitel 5.1.3).

4. Phenanthridinium-Chromophore

4.1. Hintergrund zu Farbstoffen mit Phenanthridinium-Grundgerüst

Phenanthridin, ein Stickstoff- Isoster des Phenanthrens, welches das Grundgerüst aller Phenanthridinium-Farbstoffe darstellt, wurde erstmals Ende des 19. Jahrhunderts hergestellt und charakterisiert.^[327] Bedeutung erlangte diese Verbindungsklasse allerdings erst Mitte des 20. Jahrhunderts, als ihre trypanozide^[246, 247] und antivirale^[328, 329] Wirkung erkannt wurde. Aufgrund ihrer stark mutagenen und kanzerogenen Effekte im Modellsystem ist ihr Einsatz als Wirkstoff jedoch stark eingeschränkt.^[330-333] Lediglich zur Behandlung von Trypanosomis bei Rindern werden wenige Verbindungen bis heute genutzt.^[246, 247] In der Natur treten Phenanthridin-Derivate als pflanzliche Sekundärstoffe u. a. in Erdrauchgewächsen (*Fumariaceae*), Amaryllisgewächsen (*Amaryllidaceae*) und Rautengewächsen (*Rutaceae*) auf.^[334, 335] Wegen der antimikrobakteriellen Eigenschaften dieser Verbindungen geht man davon aus, dass sie einen Teil des chemischen Abwehrsystems dieser Pflanzen darstellen.

Mitte der 60er Jahre erkannten *Elliot et al.*^[248] und *Waring et al.*,^[51] dass Ethidiumbromid (**E**; Abb. 4-1), der bekannteste Vertreter der Phenanthridinium-Derivate, durch Interkalation mit DNA wechselwirkt. Diese Wechselwirkung geht mit einem signifikanten Anstieg der Fluoreszenzintensität einher,^[25] dessen Mechanismus trotz intensiver Forschung bis heute nicht vollständig verstanden ist (vgl. Kapitel 3.5).^[256, 336-340]

Erste Synthesen von Phenanthridinium-Derivaten wurden von *Walls et al.*,^[341, 342] *Watkins et al.*^[343] und *Berg et al.*^[344] veröffentlicht, wobei zu dieser Zeit das Hauptaugenmerk auf der Verbesserung der trypanoziden Eigenschaften lag. Um Bindungseigenschaften an DNA zu untersuchen wurden zahlreiche, v. a. an Position 3, 5, 6 und 8 des Phenanthridinium-Grundgerüsts modifizierte Verbindungen hergestellt.^[336, 345-359] Es zeigte sich, dass eine Variation der Alkylgruppe an Position 5 keinerlei Auswirkungen auf die Interkalationseigenschaften der Derivate hat.^[336] Alle Verbindungen (methyliert, propyliert etc.) wirken allerdings deutlich toxischer als das ethylierte Ethidium.^[360] Die Quaternisierung an Position 5 ist wichtig für eine effiziente Interkalation, da quantenmechanische Rechnungen gezeigt haben, dass die Stabilisierungsenergie von positiv geladenen Interkalatoren deutlich höher ist als die von ungeladenen.^[337-340] Die Wechselwirkung des elektronenarmen Phenanthridinium-Gerüsts von Ethidium mit den vergleichsweise elektronenreichen DNA-Basen ist hauptsächlich durch Dispersionsenergie bedingt.^[340] Dieser Ladungstransfer-Charakter scheint eine

wichtige Rolle zu spielen, da die positive Ladung der interkalierten Phenanthridinium-Verbindung teilweise auf die Nachbarbasen delokalisiert ist,^[345] was die leicht verminderte Fluoreszenz des Farbstoffs in G-C-reicher Umgebung verglichen mit A-T-reicher Umgebung erklärt,^[102] wenn man berücksichtigt, dass Guanin das geringste Oxidationspotential aller natürlicher DNA-Basen aufweist (vgl. Kapitel 4.5.2 und 5.1.1).^[156, 361]

Die beiden exozyklischen Aminogruppen an Position 3 und 8 sind für die Interkalation in DNA nicht zwingend erforderlich, Untersuchungen von *Wakelin et al.*,^[336] *Yielding et al.*^[355] und *Leupin et al.*^[362] mit Ethidiumbromid zeigen jedoch, dass sie zur Stabilität des DNA-Farbstoff-Komplexes beitragen. Die Abwesenheit der Aminogruppe in Position 3 beeinflusst die Interkalationseigenschaften stark, was zu einer deutlich verringerten Bindungsaffinität der 3-Desamino-Verbindung an DNA führt.^[355, 362, 363] NMR-Messungen von *Leupin et al.*^[362] deuten darauf hin, dass die Abwesenheit der Aminogruppe in Position 8 nur geringe Auswirkungen auf die Bindungseigenschaften an DNA hat, während *Yielding et al.*^[355] mittels Absorptionsmessungen und *Garbett et al.*^[363] mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) eine deutlich schwächere Bindungsaffinität des 8-Desamino-Derivats, verglichen mit Ethidium detektierten. Die Entfernung beider Aminogruppen verringert die Bindungsaffinität nochmals um ca. eine Zehnerpotenz.^[355, 362, 363] Modifikationen an den Aminopositionen 3 und/ oder 8 wurden mit einer großen Bandbreite an Substituenten^[336, 346, 347, 349-355, 357-359, 362-364] durchgeführt, wobei die Bindungsaffinität meist abnahm.^[336, 347] *Luedtke et al.*^[329, 347, 365] untersuchten den Einfluss verschiedener Substituenten und nutzten die Ergebnisse dieser spektroskopischen Messungen um die Elektronendichteverteilung von Ethidium zu berechnen. Daraus ergibt sich, dass der aromatische Stickstoff und einige Kohlenstoffe überraschend hohe Elektronendichten aufweisen. Das bedeutet, dass die Elektronen-Donor-Eigenschaft der exozyklischen Aminogruppen deutlich stärkere Auswirkungen auf die Elektronenverteilung von Ethidium hat als der elektronenziehende endozyklische Iminium-Kern.^[365]

Auch an Position 6 wurde eine Reihe von Substituenten bezüglich der Bindungseigenschaften der entsprechenden Phenanthridinium-Derivate an DNA untersucht (Methyl-, Naphthyl-, 4-Aminophenyl-, 4-Nitrophenyl-, etc.).^[336] Ebenso wie die Modifikationen an Position 5 hatten die verschiedenen Substituenten an Position 6 keine gravierenden Auswirkungen auf das Bindungsverhalten der Farbstoffe an DNA.

Erstaunlicherweise haben sich die bisherigen Arbeiten, bis auf wenige Ausnahmen, hauptsächlich mit der Untersuchung der Absorptions- und Bindungseigenschaften der Phenanthridinium-Derivate an DNA beschäftigt und weniger mit ihrer Fluoreszenz.

Dementsprechend gibt es bisher nur wenige Informationen bezüglich der Auswirkungen verschiedener Substituenten v. a. an Position 6 auf die Fluoreszenzintensität und -lebenszeit. Um den Einfluss der Substituenten in Position 3, 6 und 8 des Phenanthridinium-Grundgerüst auf die photophysikalischen und elektrochemischen Eigenschaften zu untersuchen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Verbindungen 5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (**1**), 5-Ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumiodid (**2**), 3,8-Diamino-5-ethyl-6-methyl-phenanthridinium-trifluoracetat (**3**) und 3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4-*N,N*-diethylaminophenyl)-phenanthridinium-trifluoracetat (**4**) synthetisiert (Abb. 4-1). Verglichen mit Ethidium (**E**) fehlen den Verbindungen **1** und **2** die beiden Aminogruppen, bei **1** ist zusätzlich der Phenylring durch eine Methylgruppe substituiert. Die Farbstoffe **3** und **4** unterscheiden sich von **E** lediglich durch den Substituenten an Position 6: Verbindung **3** trägt statt des Phenylrests eine Methylgruppe, während Verbindung **4** am Phenylring eine zusätzliche Diethylamino-Funktion enthält, was den elektronenschiebenden Charakter des Substituenten deutlich verstärken soll.

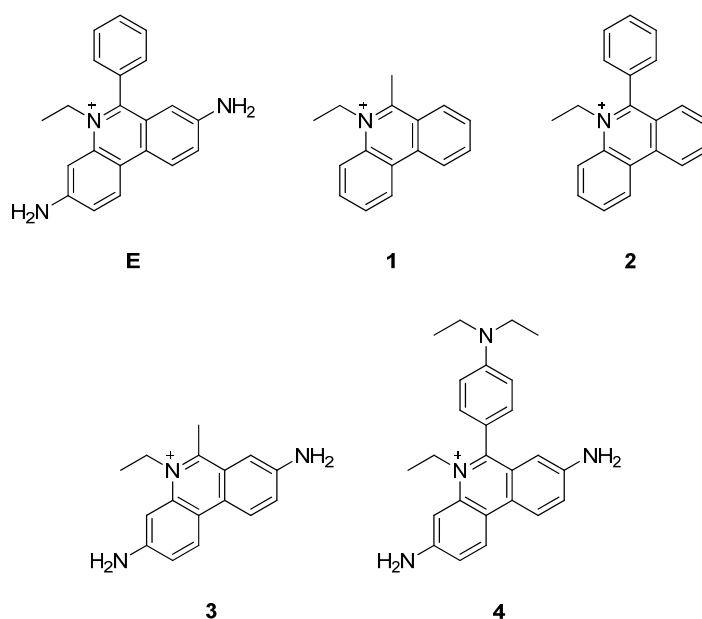


Abb. 4-1: Strukturen der untersuchten Phenanthridinium-Derivate.

Die Phenanthridinium-Derivate **1-4** wurden spektrophotometrisch, spektrofluorimetrisch und elektrochemisch untersucht und die Ergebnisse mit denen von Ethidium als Referenzsubstanz verglichen. Daraus ergaben sich neue Erkenntnisse bezüglich der Ursachen des starken Fluoreszenzanstiegs von Ethidium und Verbindung **4** bei Interkalation in DNA, die mittels quantenmechanischer Rechnungen bestätigt werden konnten.

4.2. Darstellung der Phenanthridinium-Chromophore

Zum Aufbau des Phenanthridin-Grundgerüsts wurden in der Literatur eine Reihe von Möglichkeiten beschrieben.^[327] Die wichtigsten Methoden zur Herstellung von Phenanthridinen umfassen Ringschlussreaktionen, bei denen der heterocyclische Ring entweder durch Knüpfung einer C-C-Bindung oder einer C-N-Bindung aufgebaut wird.^[334] Diese beinhalten u. a. radikalische^[366] und Pd-^[367] oder Lewis-Säure-katalysierte Ringschlüsse,^[368] Photozyklisierungen, *Schmidt*- oder *Beckmann*-Umlagerungen unter Ring-erweiterung und Integration des Heteroatoms, sowie *Pschorr*-Zyklisierungen.^[327, 334] Auch in dieser Arbeit wurden zum Aufbau des Phenanthridinium-Grundgerüsts der Farbstoffe **1-4** Ringschlussreaktionen verwendet. Die Knüpfung der C-N-Bindung erfolgte bei der Synthese der Verbindungen **1** und **2** durch eine intramolekulare nukleophile Substitution mittels Organolithiumverbindungen.^[369] Bei den Phenanthridinium-Derivaten **3** und **4** wurde der Ringschluss mit Hilfe von POCl₃ in einer *Friedel-Crafts*-katalysierten, intramolekularen elektrophilen Substitutionsreaktion, ähnlich der *Bischler-Napieralski*-Reaktion, erreicht.^[370, 371]

4.2.1. Synthese von 5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (**1**) und 5-Ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumiodid (**2**)

In dieser Arbeit wurde zur Darstellung der Phenanthridin-Vorstufen **10** und **11** ein von der Arbeitsgruppe *Begtrup* veröffentlichter Syntheseweg gewählt, bei dem der Aufbau des heterozyklischen Rings unter Knüpfung einer C-N-Bindung erfolgt. Dabei kann der Substituent an Position 6 des Phenanthridin-Grundgerüsts relativ einfach variiert werden.^[369, 372, 373] Die einzelnen Stufen der Synthese sind in Abb. 4-2 dargestellt und sollen nur kurz zusammengefasst werden.

Ausgehend von kommerziell erhältlichem Fluorbenzol (**5**) wurde durch Zugabe von Lithium-2,2,6,6-tetramethylpiperidin (LTMP) und Isopropylborat ein Isopropylboronsäureester in ortho-Position eingeführt. Nach Umesterung mit 2,2-Dimethyl-1,3-propandiol konnte Verbindung **7** als weißer Feststoff isoliert werden. Anschließend erfolgte eine Suzuki-Kupplung zwischen Verbindung **7** und dem kommerziell erhältlichen 2-Brombenzonitril (**8**) unter Standardbedingungen. Die Zyklisierung von Verbindung **9** zum Phenanthridin-Grundgerüst wurde mit Hilfe von Organolithiumverbindungen erreicht. Dabei ist hervorzuheben, dass sich der organische Rest des Lithiumorganyls nach der Zyklisierung als

Substituent in Position 6 am Phenanthridin-Grundgerüst der Verbindungen **10** und **11** befindet. Die anschließende Ethylierung an Position 5 gelang nur in Gegenwart eines großen Überschusses an Iodethan, was dazu geführt hat, dass Iodethan auch als Lösungsmittel verwendet wurde. Nach 8 d Rühren unter Rückfluss konnten die Phenanthridinium-Derivate **1** und **2** als gelbe Feststoffe isoliert werden. Diese wurden durch Umkristallisieren aus einer MeCN-EtO₂-Mischung in analysenreiner Form erhalten.

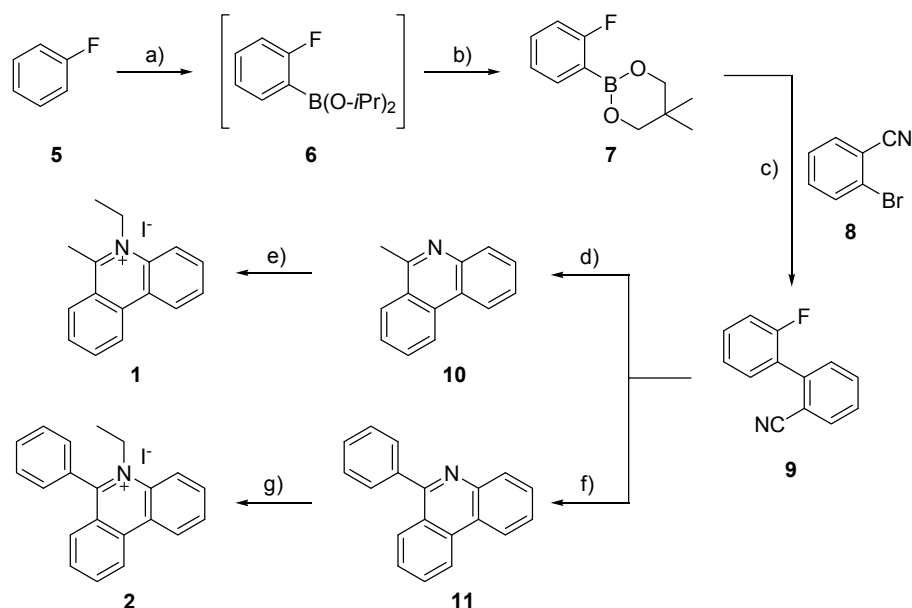


Abb. 4-2: Syntheschema zur Darstellung der Phenanthridinium-Chromophore **1** und **2**.^[369, 372, 373] a) LTMP (1,5 eq.), B(OiPr)₃ (2 eq.), THF, 2,5 h bei -78 °C, 3,5 h bei RT; b) 2,2-Dimethyl-1,3-propandiol (1,2 eq.), Toluol, 16 h, RT (98 % nach beiden Stufen); c) **8** (1,08 eq.), Pd(PPh₃)₄ (3 mol-%), 2 M K₂CO₃, Toluol/EtOH/H₂O 6:1:1, 7 h, 85 °C (89 %); d) CH₃Li (1,05 eq.), THF, 45 min., -78 °C bis RT (82 %); e) Iodethan (40 eq.), 8 d, 75 °C, (58 %); f) C₆H₅Li (1,05 eq.), THF, 45 min., -78 °C bis RT (85 %); g) Iodethan (18 eq.), 8 d, 75 °C, (63 %).

4.2.2. Synthese von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-methyl-phenanthridiniumtrifluoracetat (**3**) und 3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4-*N,N*-diethylamino)-phenyl-phenanthridiniumtrifluoracetat (**4**)

Um die Auswirkungen des Substituenten an Position 6 des Phenanthridinium-Grundgerüsts auf die spektroskopischen und elektronischen Eigenschaften, sowie das DNA-Bindungsverhalten der Phenanthridinium-Chromophore zu untersuchen, sollten die Farbstoffe **3** und **4** synthetisiert werden. Die Synthese verschiedener 3,8-Diamino-phenanthridinium-Derivate wurde bereits von *Lion et al.* veröffentlicht.^[370] Die Darstellung der Verbindungen **3**

und **4** orientiert sich an dem beschriebenen Syntheseweg, wurde aber v. a. bezüglich der Schutzgruppen verändert.

Als Ausgangsverbindung zur Herstellung der beiden Farbstoffe **3** und **4** dient das alloc-geschützte Biphenylamin-Derivat **15**, das in drei Schritten ausgehend von kommerziell erhältlichem Benzidin (**12**) synthetisiert werden kann (Abb. 4-3). Die Nitrierung von Benzidin (**12**) gelingt, wie in der Literatur beschrieben,^[370] in konz. Schwefelsäure mit Kaliumnitrat bei RT. Dabei entsteht zunächst das 2-Nitrobenzidinammoniumsulfat, aus dem durch Neutralisation mit konz. Ammoniak 2-Nitrobenzidin (**13**) als dunkelroter Feststoff freigesetzt werden kann. Vor der weiteren Umsetzung ist es nötig die beiden exozyklischen Aminogruppen zu schützen. Hierfür wurde die Allyloxycarbonyl-Gruppe (Alloc) gewählt, da sie sowohl in saurer, als auch in basischer Umgebung stabil ist und selektiv durch Pd-Katalyse unter milden Bedingungen entfernt werden kann. Außerdem hat sich die Verwendung der Alloc-Schutzgruppe bereits bei der Darstellung des Ethidiumnukleosids (**38**) (vgl. Kapitel 5.1.1) bewährt.^[102] Die Umsetzung von Verbindung **13** mit Chlorameisensäureallylester erfolgt analog zu der in der Literatur beschriebenen Methode, wobei das Alloc-geschützte Derivat **14** nach Neutralisation mit Ammoniak als hellbrauner Feststoff ausfällt. Im Anschluss daran wird die Nitro-Gruppe in Gegenwart von Eisenpulver in salzsaurer wässriger Lösung reduziert und man erhält Verbindung **15** als gelb-braunen Feststoff.

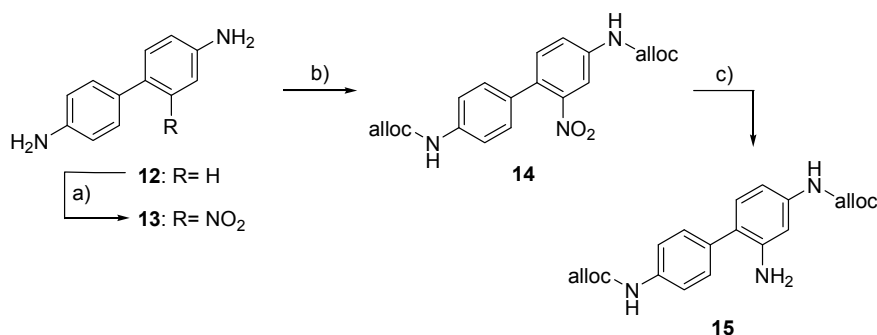


Abb. 4-3: Syntheschema zur Darstellung des alloc-geschützten Biphenylamin-Derivats **15**.^[102, 370] a) KNO₃ (1 eq.), H₂SO₄, 1,5 h, RT (97 %); b) Chlorameisensäureallylester (23 eq.), CH₂Cl₂, 24 h, RT (95 %); c) Fe-Pulver (6,7 eq.), HCl/ H₂O (pH 1-2), 1 h, 100 °C (79 %).

Verbindung **15** wird anschließend an der freien Aminogruppe acyliert, wobei der Rest des verwendeten Säurechlorids später dem Substituenten an Position 6 des Phenanthridin-Grundgerüsts entspricht. Zur Darstellung des Farbstoffs **3** wird Verbindung **15** demnach mit Acetylchlorid umgesetzt, wodurch man nach Umkristallisieren aus Chlorbenzol Verbindung **16** in Form eines beigen Feststoffs erhält (Abb. 4-4). Die Zyklisierung zum Phenanthridin-

Derivat **15** erfolgt mit Hilfe von POCl_3 in einer *Friedel-Crafts*-katalysierten, intramolekularen elektrophilen Substitutionsreaktion, die der sog. *Bischler-Napieralski*-Reaktion zur Synthese von Isochinolinen stark ähnelt.^[370, 371] Nach Entfernen von überschüssigen POCl_3 im Wasserstrahlvakuum und Neutralisieren mit konz. Ammoniak kann Verbindung **17** als hellgelber Feststoff isoliert werden. Ebenso wie bei der Darstellung der Phenanthridin-Derivate **1** und **2** (vgl. Kapitel 4.2.1) gelingt auch die Ethylierung von Verbindung **17** nur in Gegenwart eines großen Überschusses an Iodethan. Da **17** in Iodethan allerdings nicht ausreichend löslich ist, wird zusätzlich Nitromethan als Lösungsmittel benötigt. Nach 7 Tagen Rühren unter Rückfluss kann das allocgeschützte Phenanthridinium-Derivat **18** als gelber Niederschlag isoliert werden. Im letzten Schritt erfolgt die Entschützung der exozyklischen Aminogruppen unter den etablierten Bedingungen mit Bu_3SnH und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$.^[102] Die Umsetzung zum violettfarbenen Produkt erfolgt nahezu quantitativ, allerdings gestaltet sich die anschließende Aufreinigung als problematisch, da Flash-Säulenchromatographie, präparative Dünnschichtchromatographie und Umkristallisation erfolglos blieben. Nur durch Aufreinigung mittels präparativer RP-HPLC kann die analysenreine Verbindung **3** erhalten werden, wobei unter den gewählten Bedingungen das Gegenion I^- gegen CF_3CO_2^- ausgetauscht wird.

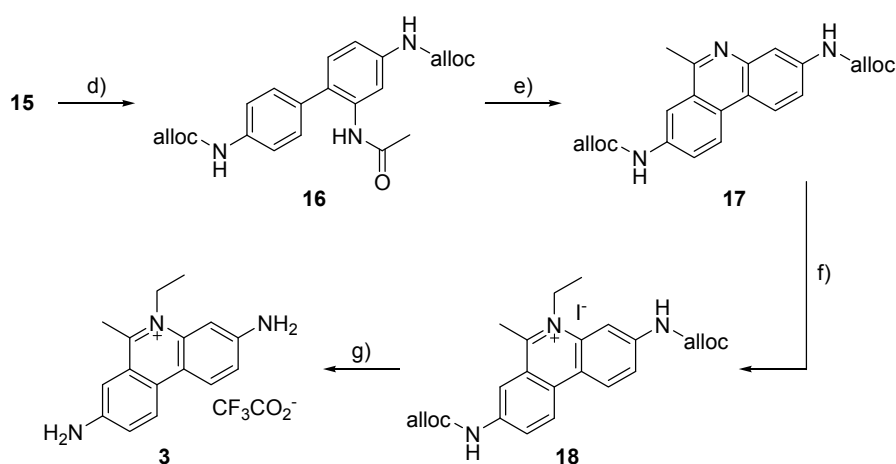


Abb. 4-4: Syntheschema zur Darstellung des Phenanthridinium-Derivats **3**.^[327, 370] d) Acetylchlorid (15 eq.), CH_2Cl_2 , 48 h, RT (73 %); e) POCl_3 (50 eq.), 3 h, 110 °C (85 %); f) Iodethan (21 eq.), Nitromethan, 7 d, 105 °C (68 %); g) Bu_3SnH (3 eq.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2 mol%), PPh_3 (20 mol%), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ 300/1, 90 min., RT (73 %).

Zur Untersuchung der Auswirkungen eines stärker elektronenschiebenden Substituenten an Position 6 des Phenanthridinium-Grundgerüst auf die spektroskopischen und elektronischen Eigenschaften dieser Verbindungsklasse wurde zunächst eine zusätzliche *N,N*-Dimethylgruppe in *para*-Stellung am Phenylring in Erwägung gezogen (vgl. Verbindung **23**, Abb. 4-5). Dazu wird Verbindung **15** analog der Darstellung von Farbstoff **3** mit dem kommerziell

erhältlichen 4-*N,N*-Dimethylaminobenzoylchlorid (**19**) umgesetzt, wodurch man Verbindung **20** als gelblich weißen Feststoff erhält. Die anschließende Zyklisierung mit POCl₃ zur orangefarbenen Verbindung **21** erfolgt ebenfalls problemlos. Die Ethylierung an Position 5 gestaltet sich allerdings als schwierig, da diese nur bei großem Überschuss an Iodethan funktioniert. Unter diesen Bedingungen erfolgt jedoch auch ein Austausch der Methylreste an der Dimethylaminogruppe, wodurch ein Produktgemisch aus dimethyl-, ethylmethyl- und diethylaminophenylsubstituierten Phenanthridinium-Derivaten (**22a-c**) entsteht. Aufgrund der zu geringen strukturellen Unterschiede ist eine Trennung dieser Verbindungen nicht möglich. Durch Methylierung der Position 5 könnte man dieses Problem umgehen, entsprechende Produkte sind allerdings deutlich toxischer.^[360]

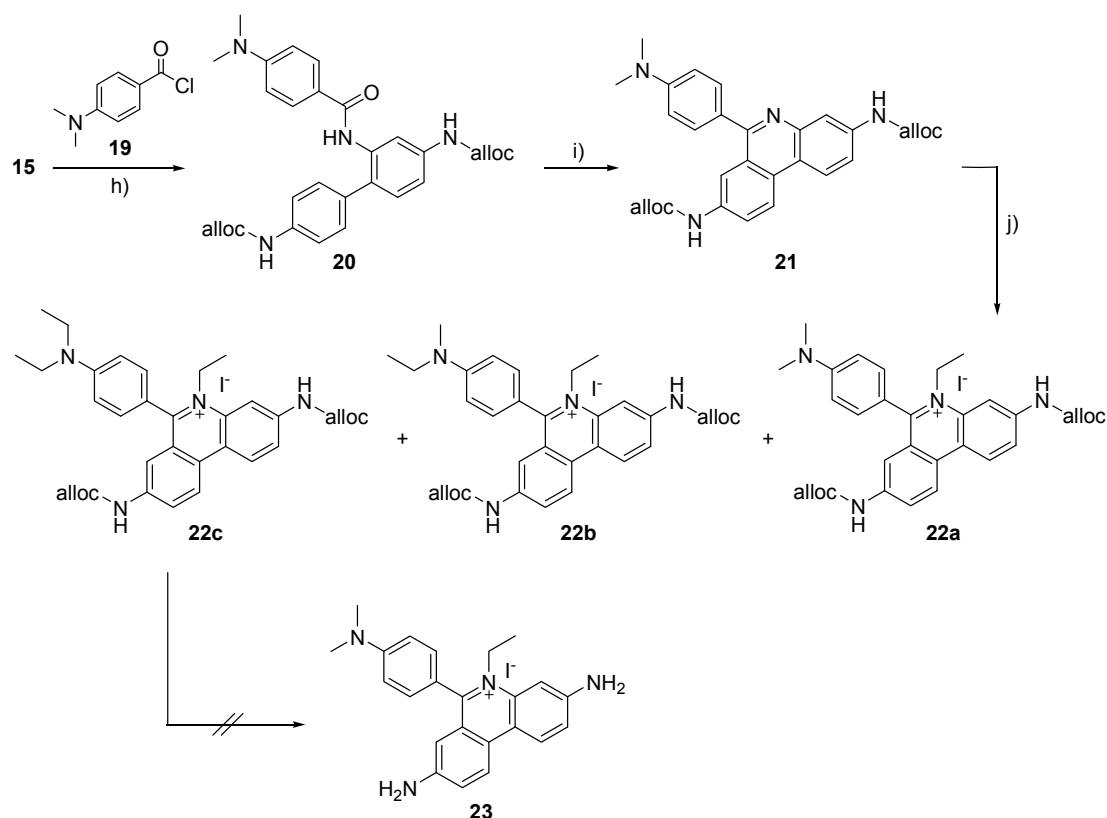


Abb. 4-5: Geplante Darstellung des Phenanthridinium-Derivats **23**.^[327, 370] h) **19** (2 eq.), DIPEA (1 eq.), CH₂Cl₂, 3 d, RT (95 %); i) POCl₃ (110 eq.), 4 h, 110 °C (84 %); j) Iodethan (20 eq.), THF, 5 d, 70 °C.

Aus diesem Grund schien es sinnvoller, die 4-*N,N*-Dimethylaminophenylgruppe gegen eine 4-*N,N*-Diethylaminophenylgruppe auszutauschen, da die Elektronen-Donor Eigenschaften beider Substituenten im Phenanthridinium-Grundgerüst nahezu identisch sein müssten. Dazu wird 4-*N,N*-Diethylaminobenzoylchlorid (**25**) benötigt, das aus 4-*N,N*-Diethylaminobenzoesäure (**24**) und Thionylchlorid hergestellt werden kann (vgl. Abb. 4-6). Da Säurechloride im

Allgemeinen hydrolyseempfindlich sind, wird **25** ohne weitere Aufreinigung unmittelbar nach der Synthese mit Verbindung **15** umgesetzt, wodurch man Verbindung **26** als gelblich weißen Feststoff erhält. Die Zyklisierung zur orangefarbenen Verbindung **27** verläuft mit POCl_3 analog zur Darstellung von **17** und **21**. Das Phenanthridin-Derivat **27** ist ebenso wie Verbindung **17** in Iodethan nicht ausreichend löslich, um eine Ethylierung an Position 5 zu ermöglichen. Mit THF als Lösungsmittel kann nach 7 Tagen Rühren unter Rückfluss Verbindung **28** als gelber Feststoff isoliert werden. Das Entfernen der Alloc-Schutzgruppen im letzten Schritt erfolgt auch hier nach der etablierten Methode mit Bu_3SnH und $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$. Ebenso wie bei der Entschützung von Verbindung **18** erhält man eine nahezu quantitative Umsetzung, allerdings ist auch hier eine Aufreinigung mittels RP-HPLC erforderlich. Daher enthält die analysenreine Verbindung **4** ebenso wie Verbindung **3** $\text{CF}_3\text{COO}_2^-$ als Gegenion.

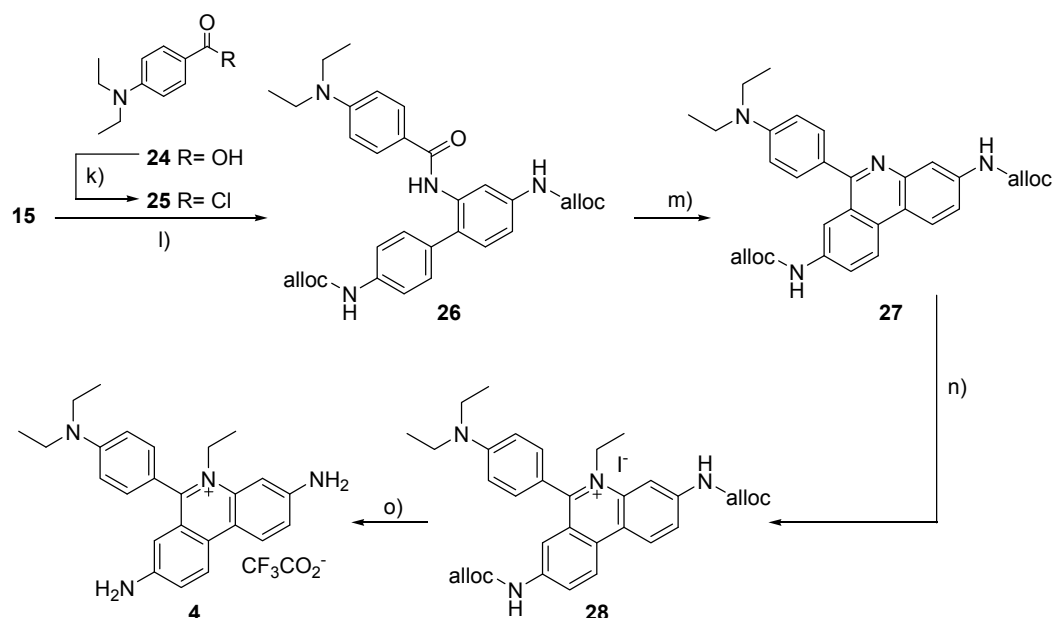


Abb. 4-6: Syntheseschema zur Darstellung des Phenanthridinium-Chromophors **4**. ^[327, 370] k) **24**, Thionylchlorid (3 eq.), CH_2Cl_2 , 16 h, RT; l) **25** (1,7 eq.), DIPEA (1,5 eq.), CH_2Cl_2 , 3 d, RT (67 % nach beiden Stufen); m) POCl_3 (45 eq.), 6 h, 110 °C (74 %); n) Iodethan (40 eq.), THF, 7 d, 70 °C (65 %); o) Bu_3SnH (3 eq.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (2 mol%), PPh_3 (20 mol%), $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$ 300/1, 90 min., RT (58 %).

4.3. Spektroskopische Charakterisierung von Ethidium und 1-4

Bei den hergestellten Phenanthridinium-Derivaten **1** und **2** handelt es sich um gelbe kristalline Verbindungen, die Farbe des Phenanthridinium-Derivats **4** im festen Zustand erinnert an die violette Farbe des Ethidiums, während der Farbstoff **3** als dunkelroter Feststoff vorliegt. Durch Umkristallisieren aus einer MeCN-EtO₂- bzw. einer THF-Heptan-Mischung konnten Kristallstrukturen der Verbindungen **1** bzw. **4** erhalten werden, die in Abb. 4-7 gezeigt sind. Die Ergebnisse der Kristallstrukturmessungen von Farbstoff **1** (vgl. Kapitel 7.6.1) stimmen mit den bereits bekannten Daten von 5,6-Dimethyl-phenanthridinium Chlorid^[365] sehr gut überein. Bei Verbindung **4** sind im Vergleich zur Kristallstruktur von Ethidium^[365] lediglich die beiden C-C-Bindungen am Phenylring leicht verlängert, die sich unmittelbar neben dem *N,N*-Diethylamino-Substituenten befinden. Auf die restlichen Bindungslängen im Kristall hat der zusätzliche elektronenschiebende Substituent keinen Einfluss. Der Ethyl- und der 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituent von Verbindung **4** sind so orientiert wie in der Kristallstruktur von Ethidium. Der 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituent von Verbindung **4** ist in einem Torsionswinkel von ca. 80° gegen das Phenanthridinium-Grundgerüst verdreht, was auch mit einem Wert von ca. 83° für Ethidium übereinstimmt.^[374]

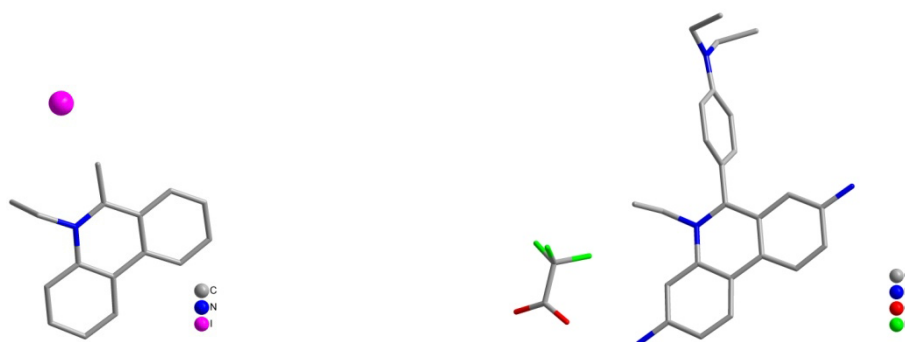


Abb. 4-7: Kristallstrukturen der Phenanthridinium-Derivate **1** (links) und **4** (rechts).

Die Lösungen der Verbindungen **1** und **2** sind unabhängig vom Lösungsmittel nahezu farblos. Je nach Konzentration und Art des Lösungsmittels variiert der Farbton von **3** und **4** in Lösung ähnlich wie der von gelöstem Ethidium zwischen gelb und orange-rot. Die Lösungen aller Phenanthridinium-Derivate in wässriger Pufferlösung sind in Abb. 4-8 gezeigt.

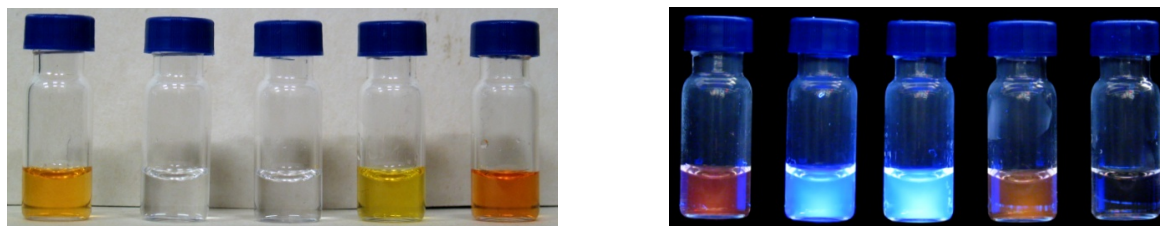


Abb. 4-8: Links: Lösungen der Phenanthridinium-Derivate **E**, **1**, **2**, **3** und **4** ($c=250\ \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7). Rechts: Fluoreszenz der Lösungen ($c=25\ \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7)

4.3.1. Spektroskopisches Verhalten in wässrigen Lösungen

Die Phenanthridinium-Derivate **1**, **2**, **3** und **4** wurden mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie untersucht. Um herauszufinden, welche Auswirkungen die Substituenten an Position 3, 6 und 8 auf die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften von Phenanthridinium-Derivaten haben, wurden die gleichen Messungen auch mit Ethidium als Referenzverbindung durchgeführt.

Da Titrationsexperimente mit DNA geplant waren, wurden zunächst UV/Vis- und Emissionsspektren aller Verbindungen in wässriger Pufferlösung (pH 7) aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4-9 dargestellt.

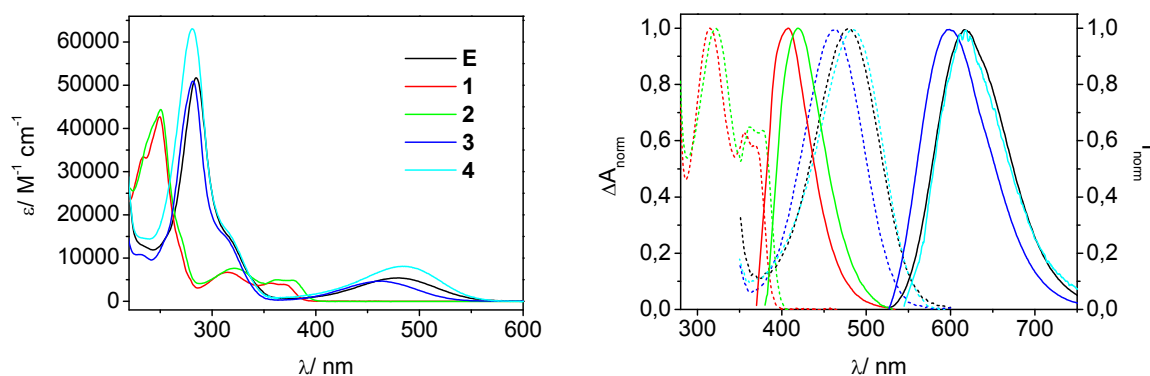


Abb. 4-9: Extinktionskoeffizienten (links; $c=23\ \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C) und normierte Absorptions- und Emissionsspektren (rechts; gestrichelte Linie: normierte Absorption; durchgezogene Linie: normierte Fluoreszenz; $c=2,4\ \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C) der Phenanthridinium-Derivate **1-4** im Vergleich zu Ethidium.

Wie man anhand der Spektren erkennen kann, unterscheiden sich sowohl die Absorptions- als auch die Emissionseigenschaften der Verbindungen **1** und **2** in wässriger Puffer-Lösung (pH 7) deutlich von denen der Derivate **3**, **4** und **E**. Während die langwelligste Absorptionsbande der Farbstoffe **1** und **2** im Bereich von ca. 370 nm liegt, weisen die Verbindungen **3**

und **4** ebenso wie Ethidium eine sogenannte *Charge-Transfer*-Bande im Bereich von 460 nm bis 490 nm auf. Die Extinktionskoeffizienten der Verbindungen **1-3** sind mit $3800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $4900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bzw. $4600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ein wenig niedriger als die von Ethidium ($5400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und dem Farbstoff **4** mit $8200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Die Fluoreszenzmaxima der Phenanthridinium-Derivate **1** und **2** liegen bei 407 nm bzw. 420 nm, wodurch man in beiden Fällen einen Stokes-Shift von ca. 40 nm beobachtet. Im Gegensatz dazu emittieren die Verbindungen **3** und **4** mit Maxima bei 599 nm bzw. 616 nm im gleichen Wellenlängenbereich wie Ethidium (615 nm) und weisen dementsprechend ebenso wie Ethidium einen Stokes-Shift von ca. 130 nm auf. Die Fluoreszenzquantenausbeuten deuten ebenfalls auf zwei Gruppen von Phenanthridinium-Derivaten hin: Die Verbindungen **1** und **2** weisen mit 36 % bzw. 25 % relativ hohe Quantenausbeuten verglichen mit Ethidium (1,2 %) und den Farbstoffen **3** und **4** auf, deren Quantenausbeuten 1,7 % bzw. 0,016 % betragen. (Aufgrund der geringen Fluoreszenzquantenausbeute von Verbindung **4** konnte diese nicht mit Rhodamin 101 als Standard bestimmt werden, da die Fluoreszenz von **4** unterhalb des Detektionslimits lag. Daher wurde die Quantenausbeute von **4** zunächst relativ zu Ethidium in wässriger Pufferlösung (10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C) bestimmt und anschließend auf Rhodamin 101 als Standard umgerechnet.)

Um den Einfluss des pH-Werts auf die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der Phenanthridinium-Derivate zu untersuchen, wurden die Messungen auch in wässriger Pufferlösung bei pH 3 und pH 13 durchgeführt (vgl. Tabelle 4-1 und Abb. 4-10). Sowohl die Lage der Absorptions- als auch der Fluoreszenzmaxima von Ethidium und den Verbindungen **1-3** ändert sich im Vergleich zu den Ergebnissen bei pH 7 nicht. Die Extinktionskoeffizienten dieser Farbstoffe variieren leicht, allerdings ist keine Korrelation zwischen Extinktionskoeffizient und pH-Wert der Lösung erkennbar. Betrachtet man die Quantenausbeuten dieser Farbstoffe, so erkennt man, dass bei den Verbindungen **1** und **2** der pH-Wert der Lösung keinen Einfluss darauf hat. Für die Quantenausbeute von Ethidium und Verbindung **3** kann man einen Zusammenhang zwischen pH-Wert und Fluoreszenzquantenausbeute feststellen: während die Quantenausbeute beider Farbstoffe bei pH 3 um ca. 25- 30 % verglichen mit pH 7 ansteigt, sinkt sie bei einem pH-Wert von 13 auf ca. 65 %. Am deutlichsten ausgeprägt ist die pH-Abhängigkeit der Absorptions- und insbesondere der Fluoreszenzeigenschaften allerdings bei Verbindung **4**. Die Lage der Absorptionsmaxima ist bei steigendem pH-Wert der Lösung um wenige nm in Richtung kürzerer Wellenlängen verschoben. Die Werte der Extinktionskoeffizienten ändern sich, jedoch wie bei **E** und **1-3** ohne Korrelation mit dem pH-Wert der Lösung. Ein klarer Zusammenhang zwischen der Lage

der Emissionsmaxima sowie der Fluoreszenzquantenausbeute mit dem pH-Wert der Lösung ist allerdings deutlich erkennbar: die Verschiebung der Fluoreszenzmaxima bei sinkendem pH-Wert von 611 nm auf 627 nm geht mit einem ca. 36-fachen Anstieg der Fluoreszenz einher, wobei bei Verbindung **4** im Vergleich zu **E** und **3** kein weiteres Absinken der Quantenausbeute bei pH 13 beobachtet werden konnte.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse lassen sich erste Rückschlüsse bezüglich des Einflusses der Substituenten an Position 3, 6 und 8 auf die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** in wässrigen Lösungen ziehen. Die beiden Aminogruppen in Position 3 und 8 führen dazu, dass die Absorptionsspektren von **E** und den Verbindungen **3** und **4** eine ausgeprägte, zu längeren Wellenlängen verschobene *Charge-Transfer*-Bande aufweisen. Außerdem zeigen die Verbindungen einen deutlich größeren Stokes-Shift und eine signifikante Löschung der Fluoreszenz bei steigendem pH-Wert der Lösung. Eine Löschung der Fluoreszenz von Ethidium in basischer wässriger Lösung wurde auch von *Pal et al.*^[375] beobachtet. Sie führten dies auf eine verstärkte Deprotonierung der Aminosubstituenten im angeregten Zustand gemäß dem Proton-Transfer-Modell von *Olmsted* und *Kearns* zurück.^[256]

Der Phenylsubstituent an Position 6 führt sowohl bei **E** als auch bei Verbindung **2** zu einer leichten Rotverschiebung des Absorptionsmaximums und einem höheren Extinktionskoeffizienten verglichen mit den methylsubstituierten Verbindungen **3** und **1**. Außerdem weisen die phenylsubstituierten Derivate eine geringere Fluoreszenzquantenausbeute auf. Ein zusätzlicher elektronenschiebender 4-*N,N*-Diethylaminophenylrest in Position 6, wie bei Verbindung **4**, verstärkt die beschriebenen Effekte. Am deutlichsten wirkt sich das auf die Fluoreszenzquantenausbeute von Verbindung **4** in wässriger Lösung aus: diese ist bei einem pH-Wert von 7 ca. 100-fach niedriger als die von Ethidium. Eine Protonierung der 4-*N,N*-Diethylanilinogruppe bei pH 3 unterdrückt die elektronenschiebende Wirkung und führt so zu einem Anstieg der Quantenausbeute auf das ca. 36-fache. Ähnliche Effekte wurden auch von *Plaza et al.* für donormodifizierte Rhodamin-Derivate gefunden: sie erhielten einen ca. 290-fachen Anstieg der Fluoreszenz durch vollständige Protonierung des 4-*N,N*-Dimethylanilinosubstituenten.^[75] Sie führten die Beobachtungen auf die Bildung eines sog. TICT-Zustands zurück, der durch intramolekulare Rotation des 4-*N,N*-Dimethyl-anilinosubstituenten unter Beteiligung von Ladungstransferprozessen gebildet wird und eine strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustands verursacht (vgl. Kapitel 3.2.2).

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** in wässriger Pufferlösung ($c = 25 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, 20°C) bei pH-Werten von 3, 7 und 13.

Lösungsmittel	E			1			2		
	$\lambda_{Abs}^{[a]}$	$\lambda_{Fl}^{[c]}$	$\Phi_F^{[e]}$	$\lambda_{Abs}^{[a]}$	$\lambda_{Fl}^{[c]}$	$\Phi_F^{[e]}$	$\lambda_{Abs}^{[a]}$	$\lambda_{Fl}^{[c]}$	$\Phi_F^{[e]}$
	(ϵ) ^[b]	($\Delta\lambda$) ^[d]	/10 ⁻²	(ϵ) ^[b]	($\Delta\lambda$) ^[d]	/10 ⁻²	(ϵ) ^[b]	($\Delta\lambda$) ^[d]	/10 ⁻²
Puffer (pH 3)	284	-	-	249	-	-	250	-	-
	(50000)	-	-	(38900)	-	-	(43700)	-	-
	478	618	1,6	315	-	-	322	-	-
	(5200)	(140)	-	(6100)	-	-	(7500)	-	-
	-	-	-	370	408	35	377	420	24
	-	-	-	(3600)	(39)	-	(4800)	(43)	-
Puffer (pH 7)	285	-	-	250	-	-	251	-	-
	(52000)	-	-	(42500)	-	-	(44300)	-	-
	479	617	1,2	315	-	-	322	-	-
	(5400)	(138)	-	(6600)	-	-	(7600)	-	-
	-	-	-	369	408	36	377	420	25
	-	-	-	(3800)	(39)	-	(4900)	(43)	-
Puffer (pH 13)	284	-	-	249	-	-	250	-	-
	(49700)	-	-	(29100)	-	-	(39300)	-	-
	479	617	0,78	315	-	-	322	-	-
	(5100)	(138)	-	(4500)	-	-	(6700)	-	-
	-	-	-	370	408	35	378	420	22
	-	-	-	(2600)	(38)	-	(4200)	(42)	-
Lösungsmittel ^[a]	3			4					
	$\lambda_{Abs}^{[a]}$	$\lambda_{Fl}^{[c]}$	$\Phi_F^{[e]}$	$\lambda_{Abs}^{[a]}$	$\lambda_{Fl}^{[c]}$	$\Phi_F^{[e]}$			
	(ϵ) ^[b]	($\Delta\lambda$) ^[d]	/10 ⁻²	(ϵ) ^[b]	($\Delta\lambda$) ^[d]	/10 ⁻²			
Puffer (pH 3)	282	-	-	285	-	-			
	(49700)	-	-	(47500)	-	-			
	463	598	2,0	487	627	0,52			
	(4500)	(135)	-	(5600)	(140)	(43) ^[g]			
Puffer (pH 7)	282	-	-	281	-	-			
	(50800)	-	-	(63300)	-	-			
	463	599	1,7	485	616	0,016			
	(4600)	(136)	-	(8200)	(131)	(1,3) ^[g]			
Puffer (pH 13)	282	-	-	281	-	-			
	(49200)	-	-	(61400)	-	-			
	465	599	1,2	483	611	0,017			
	(4400)	(135)	-	(7600)	(128)	(1,4) ^[g]			

^[a]Absorptionsmaximum in nm. ^[b]Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. ^[c]Emissionsmaximum in nm (Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 367 \text{ nm}$ für **1** und **2**; $\lambda_{ex} = 525 \text{ nm}$ für **E** und **4**; $\lambda_{ex} = 512 \text{ nm}$ für **3**). ^[d]Stokes-Shift in nm. ^[e]Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt mit Rhodamin 101 in Ethanol ($\Phi_F = 1,0$)^[376] als Standard (**4**: Zunächst relativ zu Ethidium in wässriger Pufferlösung (10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20°C) bestimmt, dann umgerechnet auf Rhodamin 101 als Standard). ^[f]Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt mit Chininsulfat in $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ($\Phi_F = 0,546$)^[376] als Standard. ^[g]Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt relativ zu Ethidium in wässriger Pufferlösung (10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20°C).

Zur Klärung mechanistischer Details, welche die starke Fluoreszenzlöschung von Ethidium und v. a. von Verbindung **4** hervorrufen, wurden quantenmechanische Rechnungen durchgeführt, die in Kapitel 4.7 näher erläutert werden.

4.3.2. Solvatochromie von Ethidium und 1-4

Zur Untersuchung der solvatochromen Eigenschaften von Ethidium und den Phenanthridinium-Derivaten **1-4** wurden Absorptions- und Emissionsspektren in verschiedenen organischen Lösungsmitteln aufgenommen. Bei der Auswahl der Lösungsmittel wurde darauf geachtet, dass sich diese bezüglich ihrer Polarität ($E_T(30)$ -Werte),^[67] Donornummer^[377] etc. möglichst unterscheiden. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 4-10 dargestellt und in Tabelle 4-2 und 4-3 zusammengefasst.

Bei allen untersuchten Verbindungen verschieben sich sowohl die Absorptions- als auch die Emissionsmaxima in Abhängigkeit vom Lösungsmittel, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Bei den Phenanthridinium-Derivaten **1** und **2** handelt es sich um eine Verschiebung der Absorptionsmaxima von lediglich um 10- 20 nm, wobei auffällt, dass die größte Rotverschiebung in CH_2Cl_2 beobachtet wird und dass sich die Form der Spektren in THF in beiden Fällen deutlich von jener der restlichen Lösungsmittel unterscheidet. Auch der Extinktionskoeffizient der Verbindungen **1** und **2**, der ansonsten weitgehend lösungsmittelunabhängig ist, ist in THF deutlich größer, was wahrscheinlich auf spezifische Lösungsmittelleffekte zurück zu führen ist.

Die Verschiebung der Absorptionsmaxima ist bei Ethidium und den Farbstoffen **3** und **4** deutlich stärker ausgeprägt. Hier verlagert sich das langwelligste Absorptionsmaximum ausgehend von Wasser um 57- 66 nm in Richtung größerer Wellenlängen. Die stärkste Rotverschiebung der Absorption wird in allen drei Fällen mit THF als Lösungsmittel beobachtet. Auch auf die Extinktionskoeffizienten der Phenanthridinium-Derivate **E**, **3** und **4** ist ein Einfluss des Lösungsmittels deutlich erkennbar, wobei die stärksten Schwankungen für Verbindung **3** beobachtet werden ($2300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in THF bis $5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in MeOH).

Die Fluoreszenzsignale der Verbindungen **1** und **2** verschieben sich in Abhängigkeit vom Lösungsmittel um maximal 13 nm, wobei in CH_2Cl_2 in beiden Fällen eine leichte Schulter wenige nm vor dem Hauptpeak auftritt. Außerdem weist das Emissionsspektrum von Farbstoff **1** in THF eine deutliche Signalverbreiterung mit einer kleinen Schulter bei ca. 480 nm auf. Die Quantenausbeuten der Verbindung **1** liegen im Bereich zwischen 3 % und 36 %, die vom Farbstoff **2** zwischen 8 % und 51 %. In beiden Fällen wurde die niedrigste

Fluoreszenzquantenausbeute in THF detektiert. DMSO wirkt sich sehr unterschiedlich auf die Quantenausbeute der Verbindungen aus: während die Fluoreszenzquantenausbeute von **1** in DMSO bei lediglich 7 % liegt, emittiert **2** in DMSO am stärksten ($\Phi_F = 51\%$).

Im Gegensatz zum Absorptionsverhalten der Phenanthridinium-Derivate **E**, **3** und **4**, dass durch ähnlich große Verschiebungen in Abhängigkeit vom Lösungsmittel charakterisiert ist, unterscheiden sich die Verschiebungen der Emissionsmaxima stärker. Während sich das Maximum von Ethidium und **3**, das in beiden Fällen die kurzwelligste Emission in CH_2Cl_2 und die langwelligste Emission in DMSO zeigt, um 63 nm bzw. 56 nm verlagert, erfährt die Emission von Verbindung **4** lediglich eine Verschiebung um 34 nm vom kurzwelligsten Emissionsmaximum in MeCN zum langwelligsten Maximum in DMSO und THF. Die Quantenausbeuten von **E**, **3** und **4** sind in organischen Lösungsmitteln verglichen mit wässriger Pufferlösung (pH 7) höher. In CH_2Cl_2 steigt die Quantenausbeute von Ethidium und Verbindung **3** um das ca. 25-fache an, die von Verbindung **4** sogar um das ca. 100-fache. Interessanterweise hat THF sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Quantenausbeute der Verbindungen **E**, **3** und **4**: während die Fluoreszenz von **E** und **3** ähnlich stark gelöscht ist wie in wässriger Pufferlösung, ergibt sich für Verbindung **4** ein Anstieg der Fluoreszenz auf das ca. 105-fache.

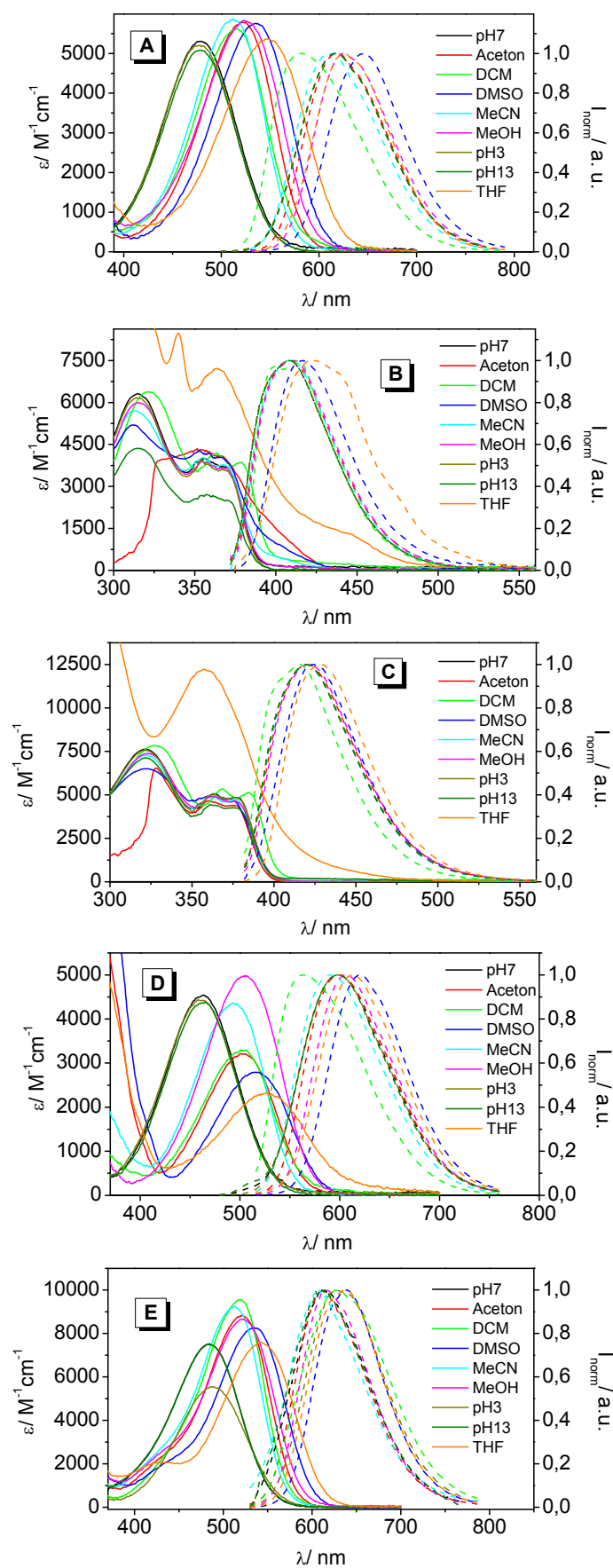


Abb. 4-10: Absorptionsmaxima, Extinktionskoeffizienten, und Fluoreszenzmaxima der Phenanthridinium-Derivate E (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D) und 4 (E) in verschiedenen Lösungsmitteln ($c = 25 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C).

Tabelle 4-2: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der Phenanthridinium-Derivate **1** und **2** in verschiedenen Lösungsmitteln ($c = 25 \mu\text{M}$ in 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 20 °C).

Lösungsmittel ^[a]	1			2		
	λ_{Abs} ^[b]	λ_{Fl} ^[d]	Φ_F ^[f]	λ_{Abs} ^[b]	λ_{Fl} ^[d]	Φ_F ^[f]
	(ϵ) ^[c]	($\Delta\lambda$) ^[e]	/10 ⁻²	(ϵ) ^[c]	($\Delta\lambda$) ^[e]	/10 ⁻²
Puffer (pH 7)	250	-	-	251	-	-
	(42500)	-	-	(44300)	-	-
	315	-	-	322	-	-
	(6600)	-	-	(7600)	-	-
	369	408	36	377	420	25
	(3800)	(39)	-	(4900)	(43)	-
MeOH	368	411	29	376	422	16
	(3800)	(43)	-	(4600)	(46)	-
MeCN	368	408	21	376	420	24
	(3700)	(41)	-	(4700)	(44)	-
DMSO	364	416	7,1	374	424	51
	(3500)	(52)	-	(4700)	(50)	-
Aceton	366	408	31	377	420	34
	(4000)	(44)	-	(4400)	(43)	-
CH ₂ Cl ₂	378	414 ^[g]	7,4	385	422 ^[h]	7,8
	(3900)	(36)	-	(5100)	(37)	-
THF	365	421	2,9	357	414	7,6
	(7300)	(56)	-	(12200)	(57)	-

^[a]Die Lösungsmittel wurden nach sinkender Lösungsmittelpolarität ($E_T(30)$ -Wert)^[67] geordnet (vgl. Kapitel 3.2.1); für wässrige NaP_i-Puffer-Lösungen wurde zur Abschätzung der Wert von Wasser verwendet. ^[b]Absorptionsmaximum in nm. ^[c]Extinktionskoeffizient in $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. ^[d]Emissionsmaximum in nm (Anregungswellenlänge $\lambda_{ex} = 367 \text{ nm}$). ^[e]Stokes-Shift in nm. ^[f]Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt mit Chininsulfat in 1 M H₂SO₄ ($\Phi_F = 0,546$)^[376] als Standard. ^[g]Zusätzliche Schulter bei 399 nm. ^[h]Zusätzliche Schulter bei 403 nm

Im Allgemeinen weisen die Verbindungen **1** und **2**, unabhängig von der Art des Lösungsmittels, höhere Quantenausbeuten im Vergleich zu **E**, **3** und **4** auf. Einzige Ausnahme stellen die Quantenausbeuten der Phenanthridinium-Derivate **E** und **3** in CH₂Cl₂ dar: sie liegen mit 30 % bzw. 51 % höher als die der Verbindungen **1** (7,4 %) und **2** (7,8 %).

Tabelle 4-3: Zusammenfassung der spektroskopischen Daten der Phenanthridinium-Derivate **E**, **3** und **4** in verschiedenen Lösungsmitteln (c= 25 μ M in 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 20 °C).

Lösungsmittel ^[a]	E			3			4		
	λ_{Abs} ^[b]	λ_{Fl} ^[d]	Φ_F ^[f]	λ_{Abs} ^[b]	λ_{Fl} ^[d]	Φ_F ^[f]	λ_{Abs} ^[b]	λ_{Fl} ^[d]	Φ_F ^[f]
	(ϵ) ^[c]	($\Delta\lambda$) ^[e]	/10 ⁻²	(ϵ) ^[c]	($\Delta\lambda$) ^[e]	/10 ⁻²	(ϵ) ^[c]	($\Delta\lambda$) ^[e]	/10 ⁻²
Puffer (pH 7)	285	-	-	282	-	-	281	-	-
	(52000)	-	-	(50800)	-	-	(63300)	-	-
	479	617	1,2	463	599	1,7	485	616	0,015
	(5400)	(138)	-	(4600)	(136)	-	(8200)	(131)	(1,3) ^[g]
MeOH	525	626	7,0	504	606	14	521	623	0,55
	(5900)	(101)	-	(5000)	(103)	-	(8700)	(102)	(46) ^[g]
MeCN	512	611	16	493	591	20	513	608	0,041
	(5900)	(99)	-	(4400)	(98)	-	(9200)	(95)	(3,4) ^[g]
DMSO	537	646	3,6	516	620	2,1	534	642	0,55
	(5800)	(110)	-	(2700)	(104)	-	(8300)	(108)	(46) ^[g]
Aceton	522	619	14	501	599	8,8	521	615	0,22
	(5800)	(97)	-	(3300)	(98)	-	(8700)	(94)	(19) ^[g]
CH ₂ Cl ₂	514	583	30	501	564	51	518	622	1,6
	(5600)	(69)	-	(3300)	(63)	-	(9500)	(104)	(131) ^[g]
THF	545	627	1,3	526	614	3,3	542	642	1,7
	(5400)	(82)	-	(2300)	(88)	-	(7600)	(100)	(141) ^[g]

^[a]Die Lösungsmittel wurden nach sinkender Lösungsmittelpolarität ($E_T(30)$ -Wert)^[67] geordnet (vgl. Kapitel 3.2.1); für wässrige NaP_i-Puffer-Lösungen wurde zur Abschätzung der Wert von Wasser verwendet. ^[b]Absorptionsmaximum in nm. ^[c]Extinktionskoeffizient in M⁻¹ cm⁻¹.

^[d]Emissionsmaximum in nm (Anregungswellenlänge: λ_{ex} = 525 nm für **E** und **4**; λ_{ex} = 512 nm für **3**). ^[e]Stokes-Shift in nm.

^[f]Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt mit Rhodamin 101 in Ethanol (Φ_F = 1,0)^[376] als Standard (**4**: Zunächst relativ zu Ethidium in wässriger Pufferlösung (10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 20 °C) bestimmt, dann umgerechnet auf Rhodamin 101 als Standard).

^[g]Fluoreszenzquantenausbeute bestimmt relativ zu einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (in 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 20 °C).

Anhand der Absorptions- und Fluoreszenzdaten der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** in verschiedenen Lösungsmitteln wurde versucht, ein Zusammenhang zwischen Lösungsmittelparametern (vgl. Kapitel 3.2.1), wie Polarität oder Donornummer,^[377, 378] und den Absorptions- bzw. Fluoreszenzeigenschaften der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** herzustellen. Für die Verbindungen **1** und **2** war es nicht möglich, eine eindeutige Korrelation der Absorptions- (Absorptionsmaximum, Extinktionskoeffizient) oder Fluoreszenzeigenschaften (Emissionsmaximum, Quantenausbeute, Stokes-Shift) mit Lösungsmittelparametern wie Polarität ($E_T(30)$ -Werte)^[67], Donor-^[377, 378] bzw. Akzeptornummer^[379], β -Werte^[377, 380] oder Funktionen (Δf)^[381] der Dielektrizitätskonstanten ϵ und der Brechungsindizes n herzustellen. Vermutlich sind es daher verschiedene Lösungsmiteileigenschaften, die je nach Lösungsmittel in unterschiedlichem Ausmaß zu den Absorptions- und Emissions-eigenschaften der Verbindungen **1** und **2** beitragen. Die Fluoreszenzdaten von Ethidium (Abb. 4-11, A) und Verbindung **3** (Abb. 4-11, B) zeigen hingegen einen deutlichen Zusammenhang sowohl zwischen Emissionsmaximum und Donornummer (DN) des Lösungsmittels (mit Ausnahme der Emission in wässriger NaP_i-Puffer-Lösung (pH 7), die in den Auftragungen mit H₂O gekennzeichnet ist; zur Abschätzung wurde als Donornummer der Wert von Wasser^[378] verwendet) als auch zwischen Quantenausbeute und DN (Abb. 4-11; C). Wie bereits in Kapitel 3.2.1 erwähnt, stellt die Donornummer ein Maß für die Fähigkeit eines Moleküls dar, freie Elektronen für eine Wasserstoffbrückenbindung zur Verfügung zu stellen. Daraus ergibt sich, dass die Fluoreszenz von **E** und **3** mit steigendem elektronenschiebenden Charakter des organischen Lösungsmittels zu längeren Wellenlängen hin verschoben und gleichzeitig gelöscht wird. Die deutliche Blauverschiebung der Emission in wässriger Pufferlösung (pH 7) ist vermutlich auf spezifische Lösungsmittelleffekte zurück zu führen. Auf die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe **E** und **3** scheinen diese spezifischen Wechselwirkungen allerdings kaum Einfluss zu haben. Für die Absorptions- und Fluoreszenzdaten von Verbindung **4** konnte keine Korrelation mit den Donornummern der aprotischen Lösungsmittel erhalten werden, die Fluoreszenzquantenausbeute korreliert hier jedoch mit der Orientierungspolarisation Δf des Lösungsmittels (vgl. Abb. 4-11; D), die ein Maß für die Lösungsmittelpolarität und -polarisierbarkeit darstellt (Berechnung vgl. Kapitel 3.2.1).

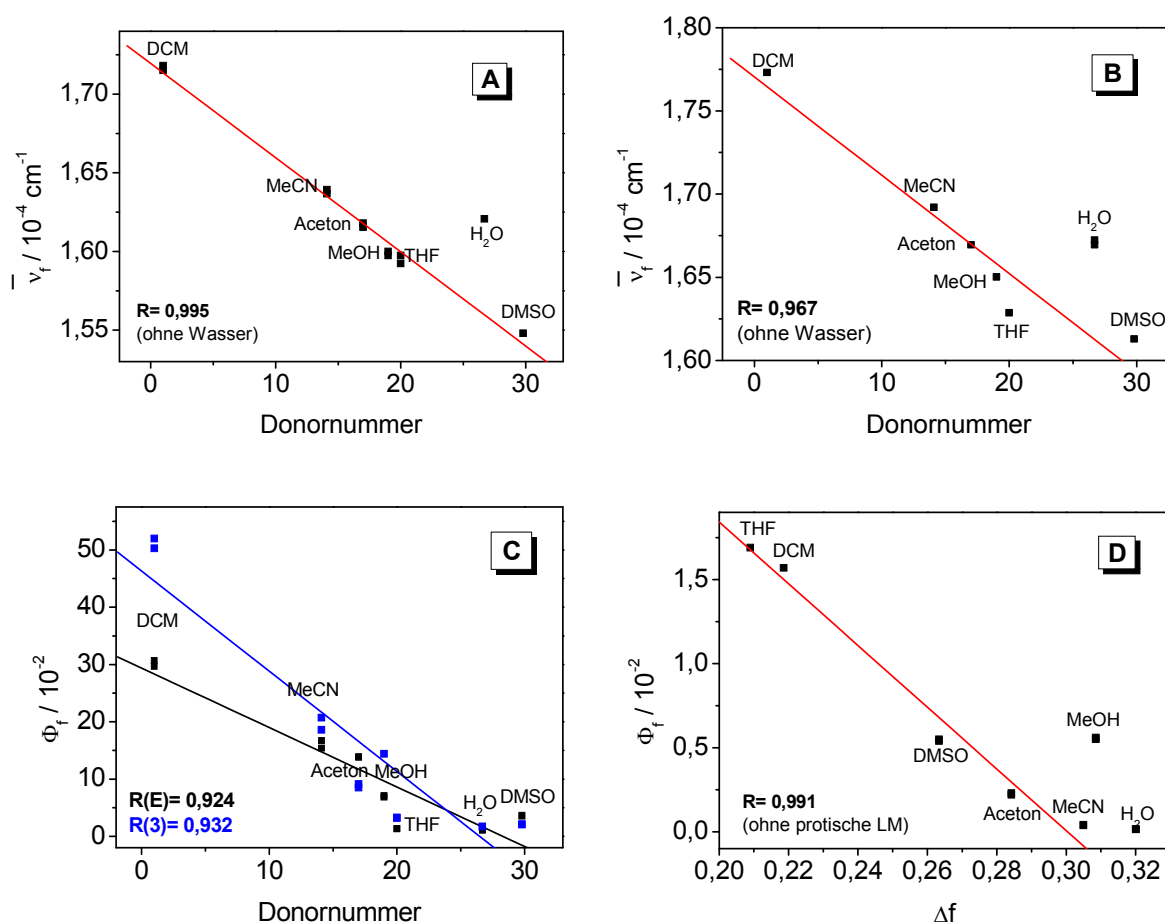


Abb. 4-11: Korrelation der Fluoreszenzmaxima von Ethidium (A) und Verbindung 3 (B) sowie der Fluoreszenzquantenausbeuten beider Phenanthridinium-Derivate (C) mit der Donornummer^[377, 378] der Lösungsmittel (mit H₂O ist in den Auftragsungen wässrige NaP_i-Puffer-Lösung (pH 7, c= 10 mM) gemeint; zur Abschätzung der Donornummer der wässrigen NaP_i-Puffer-Lösung (pH 7) wurde der Wert von Wasser verwendet). Zusammenhang zwischen Fluoreszenzquantenausbeute von Verbindung 4 mit dem Lösungsmittelparameter Δf ^[381] (D).

Die Korrelation der Emissionseigenschaften der Verbindungen E, 3 und 4 mit unterschiedlichen Lösungsmittelparametern könnte auf verschiedene (Haupt-)Ursachen der Fluoreszenzlöschung hindeuten. Die Rotverschiebung der Emissionsmaxima der Phenanthridinium-Derivate E und 3 läßt auf eine Stabilisierung des angeregten Zustands mit steigender Donornummer und damit steigender Lewis-Basizität der Lösungsmittel schließen.

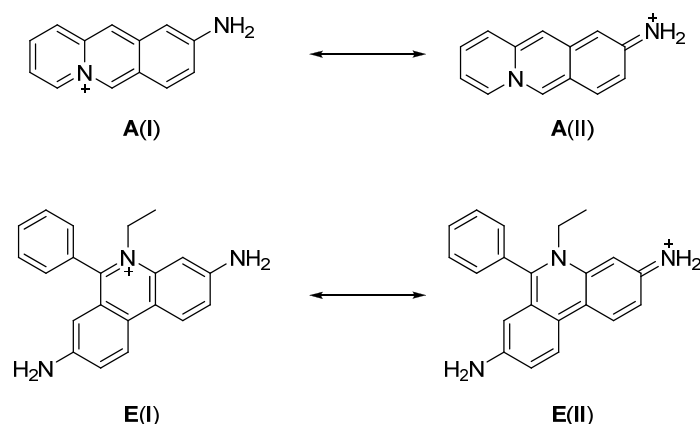


Abb. 4-12: Donor-Akzeptor-Wechselwirkung von 9-Aminoacridizinium (**A**, oben) und der Phenanthridinium-Farbstoffe **E** (unten) und **3** (nicht explizit gezeigt).

Ihmels et al.^[382] fanden eine lineare Korrelation der Absorptions- und Emissionsmaxima von 9-Aminoacridizinium (**A**) mit den Donornummern der aprotischen Lösungsmittel und Stoke-Shifts in der gleichen Größenordnung wie bei **E** und **3**. Die Donor-Akzeptor-Wechselwirkung in 9-Aminoacridizinium kann, ebenso bei **E** und **3** (vgl. Abb. 4-12), durch zwei Resonanzstrukturen dargestellt werden, wobei laut *Granzhan et al.*^[383] der Grundzustand besser durch die kanonische Struktur A(I) repräsentiert wird, während der angeregte Zustand besser durch die chinonoide Struktur A(II) wiedergegeben wird. Daher kann die Blauverschiebung der Absorption mit steigender Donornummer durch einen starken Anstieg des Dipolmoments im angeregten Zustand erklärt werden. Die Rotverschiebung der Emission bei steigender Donornummer wurde auf eine Stabilisierung des angeregten Zustands, mutmaßlich durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminoprotonen, zurückgeführt, was wahrscheinlich auch für **E** und **3** zutrifft. Die elektronische Struktur des Grundzustands von Ethidium wird durch mindestens zwei unterschiedliche ladungsgetrennte Resonanzstrukturen stark beeinflusst (vgl. Abb. 4-13), wie *Luedtke et al.* mittels Kristallstrukturuntersuchungen und NMR-Spektroskopie zeigen konnten.^[365] Die daraus resultierende ungewöhnlich hohe π -Elektronendichte an C₄ und C₇ im Grundzustand trägt wahrscheinlich dazu bei, dass keine Korrelation der Absorptionsmaxima von **E** und **3** mit den Donornummern der Lösungsmittel gefunden werden konnte.

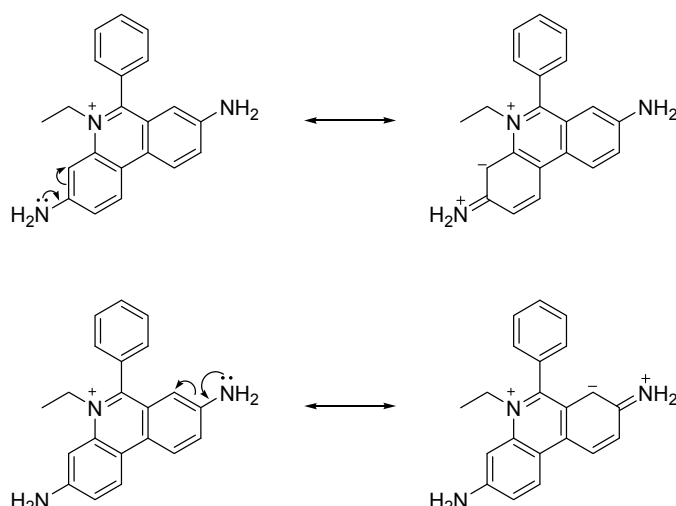


Abb. 4-13: Ladungstrennte Resonanzstrukturen von Ethidium, die laut *Luedtke et al.*^[365] einen annähernd gleichwertigen Betrag zur elektronischen Struktur im Grundzustand leisten.

Das Absinken der Fluoreszenz von **E** und **3** in nukleophilen Lösungsmitteln kann teilweise durch eine Vergrößerung der Stokes-Shifts erklärt werden, die im Allgemeinen zu einem Anstieg der Raten des strahlungslosen Zerfalls angeregter Zustände führt.^[384] Da der Stokes-Shift von **E** und **3** allerdings nicht eindeutig mit den Donornummern der Lösungsmittel korreliert werden kann, scheinen hauptsächlich spezifische Wechselwirkungen basierend auf der Lewis-Basizität der Lösungsmittel für die Löschung der Fluoreszenz von **E** und **3** verantwortlich zu sein. Auch *Pal et al.*^[375] folgerten aus der höheren Quantenausbeute von Ethidium in Acetonitril, verglichen mit der in Aceton, dass die Nukleophilie der aprotischen Lösungsmittel ausschlaggebend für die Löschung der Fluoreszenz von Ethidium sein muss. Zur Quantifizierung verwendeten sie den sog. β -Wert (vgl. Kapitel 3.2.1), der die Wasserstoffbrücken-Akzeptor-Basizität (HBA-Basizität, *Hydrogen-bond acceptor basicity*) von Lösungsmitteln repräsentiert und mit $\beta=0,48$ für Aceton höher ist ($\beta=0,31$ für Acetonitril).^[67, 380] Eine eindeutige lineare Korrelation der Quantenausbeute mit den β -Werten verschiedener Lösungsmittel wurde jedoch nicht gezeigt und konnte auch in unseren Experimenten nicht gefunden werden.

Lösungsmittel mit starken unspezifischen Polarisationskräften Δf begünstigen im Allgemeinen eine Stabilisierung polarer Strukturen. Da die Fluoreszenzquantenausbeute von Ethidium nicht mit der Orientierungspolarisation Δf korreliert werden kann, ist es wahrscheinlich, dass der elektronenschiebende 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituent in Verbindung **4** zur Ausbildung polarer Resonanzstrukturen im angeregten Zustand beiträgt. Die Löschung der Fluoreszenz in aprotischen Lösungsmitteln mit hoher Orientierungspolarisation Δf deutet darauf hin, dass hauptsächlich strahlungslos zerfallende

Zustände stabilisiert werden. Bezüglich des Mechanismus, der zur Fluoreszenzlöschung von Verbindung **4** in polaren Lösungsmitteln führt, wurden auch quantenmechanische Berechnungen durchgeführt, die in Kapitel 4.7 näher erläutert werden.

4.4. Elektrochemische Charakterisierung von Ethidium und 1-4

Zur Bestimmung des Reduktionspotentials der Phenanthridinium-Derivate im angeregten Zustand benötigt man neben der Energie des HOMO-LUMO-Übergangs E_{00} , die man aus dem Schnittpunkt der normierten Absorptions- und Fluoreszenzspektren erhält (vgl. Kapitel 3.3.1), auch die Reduktionspotentiale der Verbindungen im Grundzustand. Diese konnten durch Cyclovoltammetriemessungen (CV-Messungen) ermittelt werden. Die Cyclovoltogramme der Farbstoffe bezogen auf das Potential von Ferrocen sind in Abb. 4-14 dargestellt. Auffällig ist, dass die Reduktion von Ethidium sowie der Verbindungen **2** und **4** reversibel verläuft, während die Farbstoffe **1** und **3** eine irreversible Reduktion aufweisen. Strukturell unterscheiden sich die Verbindungen **1** und **3** von den restlichen Substanzen durch das Fehlen eines Phenylrests in Position 6 des Phenanthridinium-Grundgerüsts, der offenbar für die Reversibilität der Reduktion erforderlich ist. Verglichen mit Ethidium, das im Grundzustand ein Potential von $E_{1/2} = -1,53$ V besitzt, weisen die Phenanthridinium-Derivate **1** und **2** mit Werten von $E_{1/2} = -1,36$ V und $E_{1/2} = -1,34$ V weniger negative Potentiale auf. Dies ist auf das Fehlen der elektronenschiebenden Aminogruppen an Position 3 und 8 des Phenanthridinium-Grundgerüsts zurück zu führen, wodurch die Verbindungen leichter reduziert werden können. Geht man von einem E_{00} -Wert von ca. 3,2 eV für beide Verbindungen aus, erhält man für den angeregten Zustand Potentiale von $E^* = 1,9$ eV für **1** und $E^* = 1,8$ eV für **2**. Demnach weisen beide Verbindungen im angeregten Zustand ein deutlich höheres Reduktionspotential als Ethidium ($E^* = 0,7$ eV) auf. Die Reduktion der Farbstoffe **3** und **4** erfolgt im Grundzustand bei stärker negativen Potentialen von $E_{1/2} = -1,67$ V und $E_{1/2} = -1,62$ V. Da beide Potentiale niedriger liegen als das von Ethidium, lässt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Reduktionspotential im Grundzustand und dem Elektronen-Donor-Charakter des Substituenten an Position 6 des Phenanthridinium-Grundgerüsts erkennen. Mit den ermittelten E_{00} -Werten von 2,3 eV für **3** und 2,2 eV für **4** ergibt sich für den angeregten Zustand ein Reduktionspotential von $E^* = 0,6$ eV für beide Verbindungen, was bedeutet, dass beide Farbstoffe im angeregten Zustand weniger leicht reduziert werden können als Ethidium.

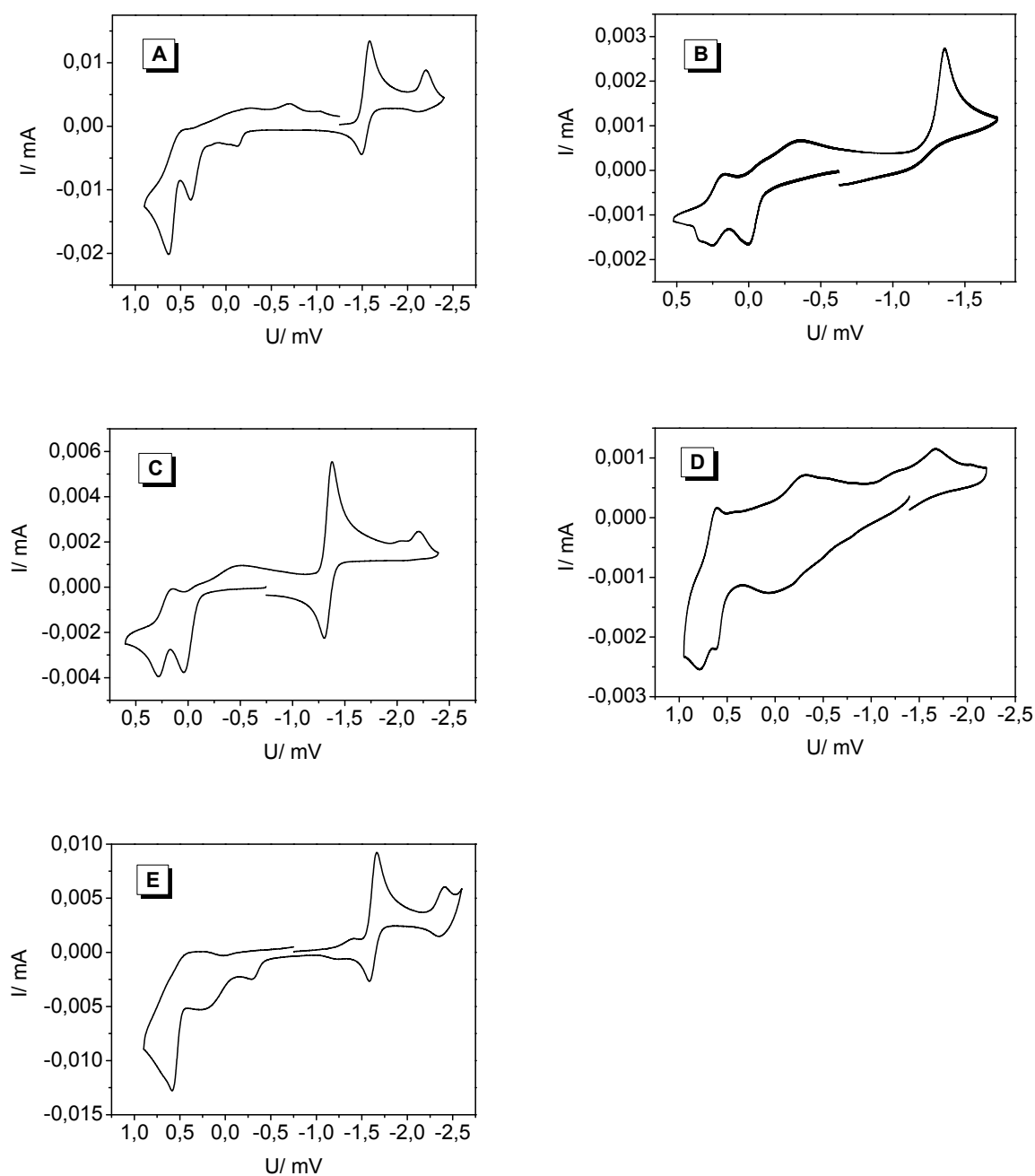


Abb. 4-14: Cyclovoltagramme der Phenanthridinium-Derivate ($c = 1 \text{ mM}$ in MeCN) **E** (A), **1** (B), **2** (C), **3** (D) und **4** (E) bezogen auf Ferrocen als Nullpunkt ($50 \text{ mM NBu}_4\text{PF}_6$ als Leitsalz, $v = 200 \text{ mV/s}$).

Die unterschiedlichen Redoxpotentiale der Verbindungen im angeregten Zustand haben u. a. starke Auswirkungen auf das Emissionsverhalten dieser Farbstoffe in Gegenwart von DNA, was in Kapitel 4.5.2 ausführlich diskutiert wird.

Tabelle 4-4: E_{00} -Werte sowie Reduktionspotentiale von **E** und **1-4** im Grundzustand ($E_{1/2}$) und im angeregten Zustand (E^*).

	$E_{00}^{[a]}$ [eV]	X^+/X^\cdot	$E_{1/2}^{[b]}$ [V]	$E^{*[c]}$ [eV]
E	2,2	E^+/E^\cdot	-1,53	0,7
1	3,2	$1^+/1^\cdot$	-1,36	1,9
2	3,2	$2^+/2^\cdot$	-1,34	1,8
3	2,3	$3^+/3^\cdot$	-1,67	0,6
4	2,2	$4^+/4^\cdot$	-1,62	0,6

^[a]Energie des HOMO-LUMO Übergangs aus dem Schnittpunkt zwischen normiertem Absorptions- und Fluoreszenzspektrum (Berechnung siehe Kapitel 3.3.1). ^[b]Reduktionspotential der Chromophore erhalten aus CV Messungen. ^[c]Reduktionspotential der Chromophore im angeregten Zustand (Berechnung siehe Kap. 3.3.1).

4.5. Titrationsexperimente der Farbstoffe Ethidium und 1-4 mit DNA

Bekanntermaßen führt die Bindung von Ethidiumbromid an DNA zu charakteristischen Änderungen der Absorptions- und Emissionseigenschaften (vgl. Kapitel 3.5). Im UV/Vis-Spektrum ist eine bathochrome Verschiebung der Banden, isobestische Punkte und ein hypochromer Effekt zu beobachten, während die signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität mit einer hypsochromen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums einhergeht. Um die optischen Eigenschaften und das Bindungsverhalten der Phenanthridinium-Derivate **1-4** mit denen von **E** vergleichen zu können, wurden Titrationsexperimente mit einem willkürlich gewählten, 17 Basenpaare (Bp) umfassenden DNA-Doppelstrang durchgeführt (**DNA1**, vgl. Abb. 4-15).

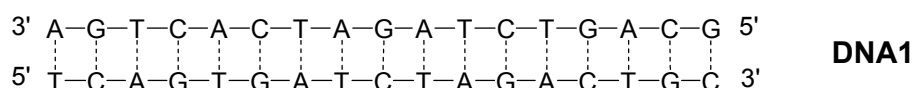


Abb. 4-15: Sequenz des DNA-Doppelstrangs, der für die Titrationsexperimente verwendet wurde (**DNA1**).

In diesen Experimenten wurde eine gepufferte wässrige Lösung (10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C) des entsprechenden Phenanthridinium-Derivats in einer Küvette vorgelegt und mit gepufferter DNA-Lösung, die zusätzlich das Phenanthridinium-Derivat in der gleichen Konzentration wie in der Küvette enthielt, schrittweise versetzt und mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie vermessen. So konnte eine Verdünnung der Farbstoff-Lösung durch DNA-Zugabe verhindert werden.

4.5.1. Spektrophotometrische Titrationsen und Bestimmung der Bindungsparameter

Titrationsexperimente der Phenanthridinium-Derivate Ethidium und **1-4** mit **DNA1** wurden bei einer Farbstoffkonzentration von 23 μM durchgeführt und mittels UV/Vis-Spektroskopie verfolgt. Die Änderungen der Absorptionsspektren bei Zugabe von DNA sind in Abb. 4-16 dargestellt.

Bei allen untersuchten Verbindungen wurde durch Zugabe von **DNA1** eine Verringerung des Extinktionskoeffizienten und das Auftreten von mindestens einem isobestischen Punkt beobachtet. Allerdings zeigt sich erneut, dass sich die Absorptionsspektren der Phenanthridinium-Derivate **3** und **4** auch in Gegenwart von DNA sehr „ethidiumähnlich“ verhalten, während sich die Spektren von **1** und **2** deutlich von denen des Ethidiums unterscheiden. Die UV/Vis-Spektren der Phenanthridinium-Derivate **1** und **2** weisen bei DNA-Zugabe neben einer sehr geringen Verschiebung der Maxima (3- 5 nm) und einer leichten Verbreiterung der Signale nur einen isosbestischen Punkt (378 nm bzw. 388 nm) und eine Intensitätsabnahme auf (Abb. 4-16, B und C). Die Spektren von **3** und **4** zeigen hingegen zusätzlich eine signifikante Rotverschiebung der langwelligsten Absorptionsbande, wie es auch für Ethidium bekannt ist. Ethidium zeigt typischerweise eine Verschiebung der *Charge-Transfer*-Bande von 479 nm für „freies“ Ethidium zu 522 nm für interkaliertes Ethidium mit isobestischen Punkten bei 385 nm und 510 nm (Abb. 4-16, A). Auch im Falle von **3** und **4** erhält man in Gegenwart von DNA eine Verschiebung der *Charge-Transfer*-Bande um ca. 40 nm. Die Interkalation von **3** bedingt eine Verschiebung des langwelligsten Absorptionsmaximums von 463 nm auf 503 nm mit isosbestischen Punkten bei 379 nm und 492 nm, während das Absorptionsmaximum des Phenanthridinium-Derivats **4** von 486 nm auf 528 nm verschoben wird (mit isosbestischen Punkten bei 378 nm und 510 nm; vgl. Abb. 4-16, D und E).

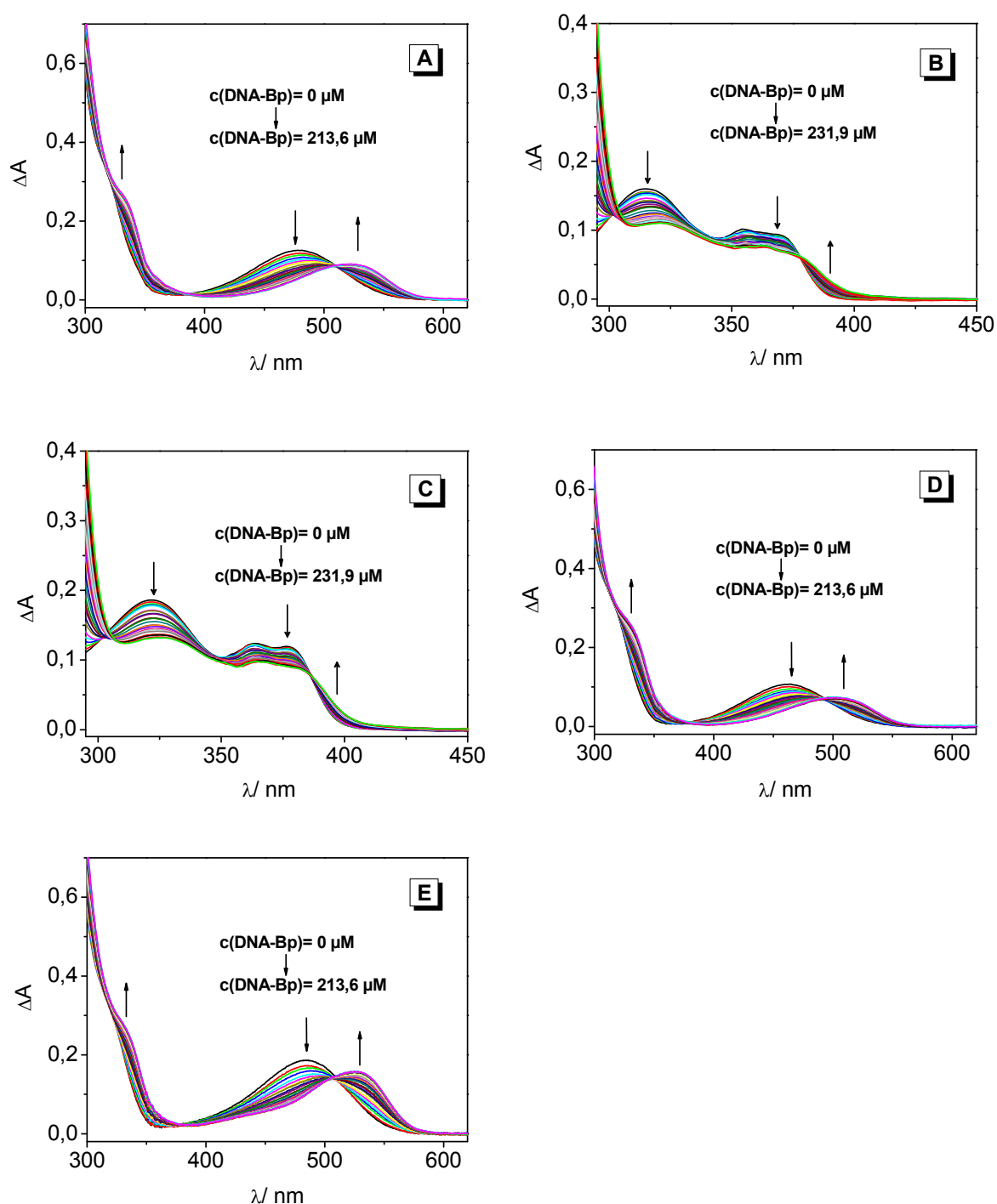


Abb. 4-16: Spektrophotometrische Titration der Phenanthridinium-Derivate ($c = 23 \mu\text{M}$) Ethidium (A), **1** (B), **2** (C), **3** (D) und **4** (E) mit **DNA1** in gepufferter wässriger Lösung (10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C). Die Pfeile kennzeichnen die Änderung der Absorptionsbanden bei steigender DNA-Konzentration an.

Die deutliche Abnahme der Absorption und die bathochrome Verschiebung der Absorptionsmaxima der Phenanthridinium-Derivate, v. a. bei **E**, **3** und **4**, durch Zugabe von **DNA1** weisen auf eine starke Assoziation zwischen Farbstoff und DNA hin.^[385] Außerdem

deuten die isosbestischen Punkte, die bei steigender DNA-Konzentration bei allen Farbstoffen beobachtet wurden, darauf hin, dass ein bestimmter Bindungsmodus bevorzugt wird. Zur Bestimmung der intrinsischen Bindungskonstante K zwischen Farbstoff und DNA und des zugehörigen Ausschlussparameters n wurden die Daten der Absorptionstitrationen in Form eines *Scatchard-Plots*^[83] aufgetragen (vgl. Abb. 4-17) und entsprechend des Nachbargruppenausschlussmodells von *McGhee* und *von Hippel*^[86] ausgewertet.

$$\frac{r}{[L_f]} = K \cdot (1 - n \cdot r) \cdot \left(\frac{1 - n \cdot r}{1 - (n-1) \cdot r} \right)^{n-1} \quad \text{Gleichung 4-1}$$

Wie in Kapitel 3.2.3 bereits erwähnt, geht man bei der Herleitung des Modells von unendlich vielen Bindungsstellen aus, da u. a. sogenannte End-Effekte bei kürzeren Strängen eine größere Rolle spielen und das Ergebnis verfälschen können. Nach den Berechnungen von *Epstein*^[386] ist dieser Fehler allerdings im Falle von nicht-kooperativer Bindung der Liganden und bedachter Wahl der Konzentrationen schon bei kurzen Strängen sehr gering, was die Anwendung des Modells auf das hier untersuchte System rechtfertigt. Außerdem steht dabei der Vergleich mit Ethidium im Vordergrund, das unter den gleichen Bedingungen gemessen wurde wie die restlichen Phenanthridinium-Derivate, wodurch mögliche systematische Fehler vernachlässigt werden können.

Für Ethidium als Referenzverbindung erhielt man eine Bindungskonstante von $5,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ mit einer Belegung von 1,6 Basenpaaren pro Ethidium-Molekül. Beide Werte stimmen gut mit den Ergebnissen von *Zimmermann et al.*^[82, 387] und *Horowitz et al.*^[388] überein, liegen jedoch ca. 25-fach höher als die von *Waring*,^[389, 390] was wahrscheinlich auf die deutlich höhere Salzkonzentration in seinen Messungen zurück zu führen ist. Die Bindungskonstanten der restlichen Phenanthridinium-Derivate spiegeln den starken Einfluss der exozyklischen Aminogruppen wider. Während die Farbstoffe **3** und **4**, ebenso wie **E**, Bindungskonstanten im Bereich von 10^5 M^{-1} aufweisen ($3,1 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ für **3**, $7,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ für **4**), liegen die der Farbstoffe **1** und **2** um ca. eine Größenordnung niedriger ($5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ für **1**, $7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ für **2**). Dies entspricht den Resultaten von *Pauluhn et al.*^[387] die für **2** eine Bindungskonstante in der gleichen Größenordnung fanden. *Garbett et al.*^[363] fanden eine ca. 10-fach niedrigere Bindungskonstante für **2**, was vermutlich durch eine höhere Salzkonzentration in ihren Messungen bedingt ist. Erstaunlicherweise steigt die Bindungskonstante der Farbstoffe **E**, **3** und **4** in der Reihenfolge **3** < **E** < **4** ebenso wie der elektronenschiebende Charakter des Substituenten in Position 6 dieser Farbstoffe.

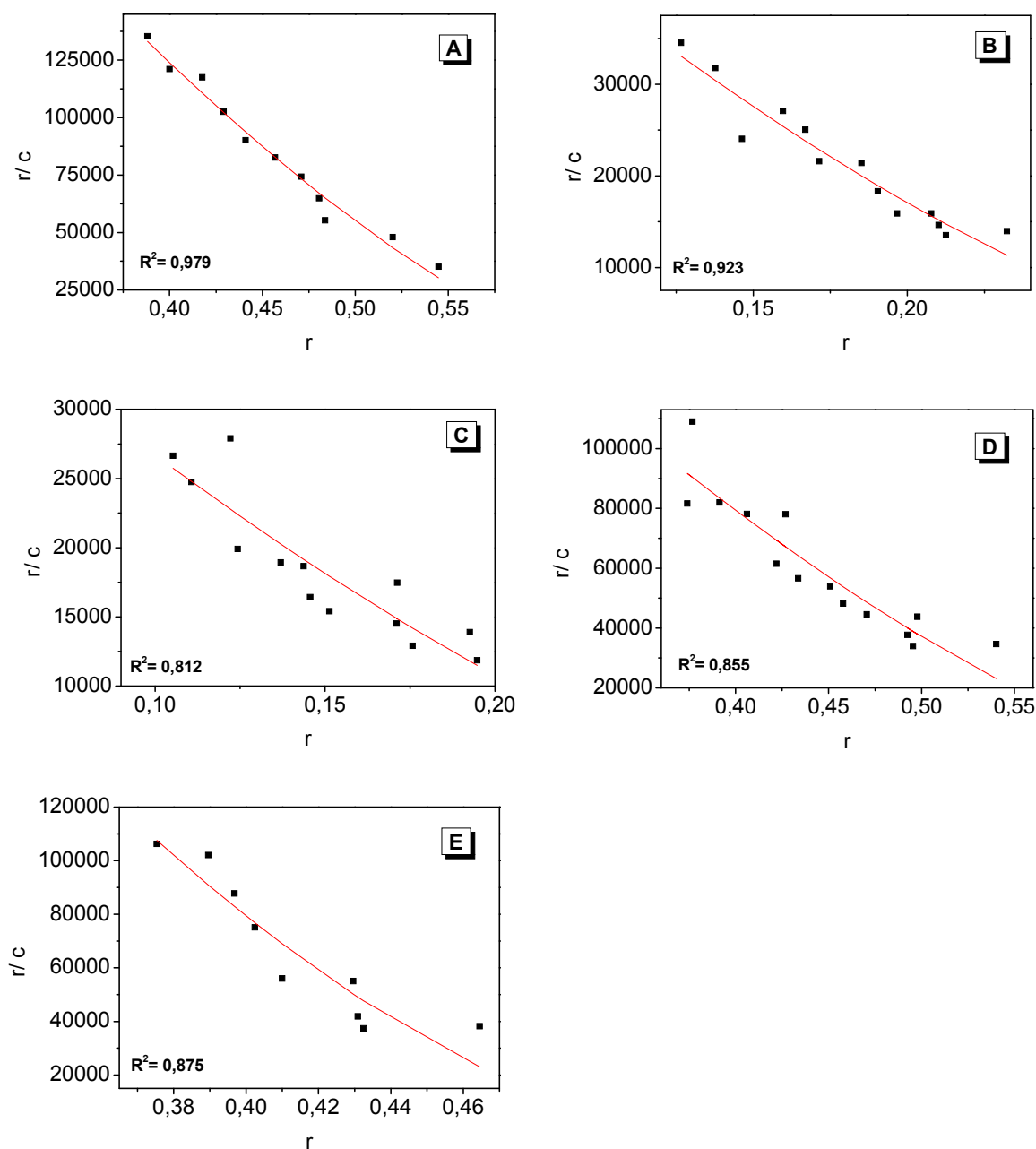


Abb. 4-17: *Scatchard-Plots*^[83] der spektrophotometrischen Titrations der Phenanthridinium-Derivate ($c = 23 \mu\text{M}$) Ethidium (A), **1** (B), **2** (C), **3** (D) und **4** (E) zur Bestimmung der intrinsischen Bindungskonstanten K und des Ausschlussparameters n in gepufferter wässriger Lösung (10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C). Um systematische Ungenauigkeiten zu vermeiden, gingen in die Auswertung nur Messpunkte mit einer Sättigungsfraction zwischen 0,3 und 0,85 ein. Die Linien stellen den besten Fit nach dem Modell von McGhee und von Hippel dar.^[86]

Die Anzahl belegter Bindungsstellen pro Farbstoffmolekül liegt für alle untersuchten Verbindungen im Bereich von 1,5- 2,8 Basenpaaren, was stark auf eine Interkalation gemäß dem „Nachbarausschlussprinzip“ hindeutet, wonach bei einer Interkalation nur jede zweite Bindungsstelle besetzt werden kann.^[391] Diese Ergebnisse allein reichen noch nicht aus, um

die Wechselwirkung zwischen DNA und Farbstoffmolekül zweifelsfrei als Interkalation zu identifizieren. Dazu benötigt man weitere Untersuchungen z. B. durch CD-, LD-, oder NMR-Spektroskopie.^[38, 392] In dem hier vorliegenden Fall kann darauf allerdings verzichtet werden, da Ethidium einen der bekanntesten Interkalatoren darstellt und man daher davon ausgehen kann, dass dies auch auf die restlichen untersuchten Phenanthridinium-Derivate zutrifft.^[336, 339, 340, 393]

Tabelle 4-5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Absorptions- und Fluoreszenztitrationen von **E** und **1-4** mit **DNA1** (Absorption: $c(\mathbf{X}) = 23 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{DNA1}) = 213,6 \mu\text{M}$; Fluoreszenz: $c(\mathbf{X}) = 2,4 \mu\text{M}$, $c(\mathbf{DNA1}) = 109,3 \mu\text{M}$; alle Messungen in 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 20 °C)

X	$\lambda_{Abs} [\text{nm}]$			$\lambda_{Fl} [\text{nm}]$			$K^{[a]} \cdot 10^5 [\text{M}^{-1}]$	$n^{[b]}$
	frei	gebunden	shift $\Delta\lambda$	frei	gebunden	shift $\Delta\lambda$		
E	285	– ^[c]	-	615	601	14	$5,0 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,1$
	479	522	43					
1	250	– ^[c]	-	407	407	0	$0,67 \pm 0,05$	$2,7 \pm 0,1$
	315	320	5					
	369	369	0					
2	251	– ^[c]	-	420	420	0	$0,46 \pm 0,05$	$2,8 \pm 0,2$
	322	325	3					
	377	378	1					
3	282	– ^[c]	-	599	583	16	$3,1 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,1$
	463	503	40					
4	281	– ^[c]	-	616	601	15	$7,8 \pm 1,6$	$1,9 \pm 0,1$
	486	528	42					

^[a]Bindungskonstanten (in Bp) und ^[b]Anzahl belegter Bindungsplätze (in Bp) bestimmt nach dem Modell von McGhee und von Hippel.^[86] ^[c]Konnte aufgrund der Überlagerung mit der Absorption der DNA nicht bestimmt werden.

4.5.2. Spektrofluorimetrische Titrationsen

Die spektrofluorimetrischen Titrationsen der Phenanthridinium-Derivate Ethidium und **1-4** mit **DNA1** wurden bei einer Farbstoffkonzentration von $2,4 \mu\text{M}$ in wässriger Pufferlösung durchgeführt. Anhand der UV/Vis-Titrationsen (vgl. Kapitel 4.5.1) kann man deutlich erkennen, dass die Wechselwirkung zwischen Farbstoff und DNA zu signifikanten Veränderungen im Absorptionsspektrum des Farbstoffs führt. Daher wurde als Anregungswellenlänge die des jeweils langwelligsten isosbestischen Punkts gewählt, der aus den UV/Vis-Titrationsen bestimmt wurde.

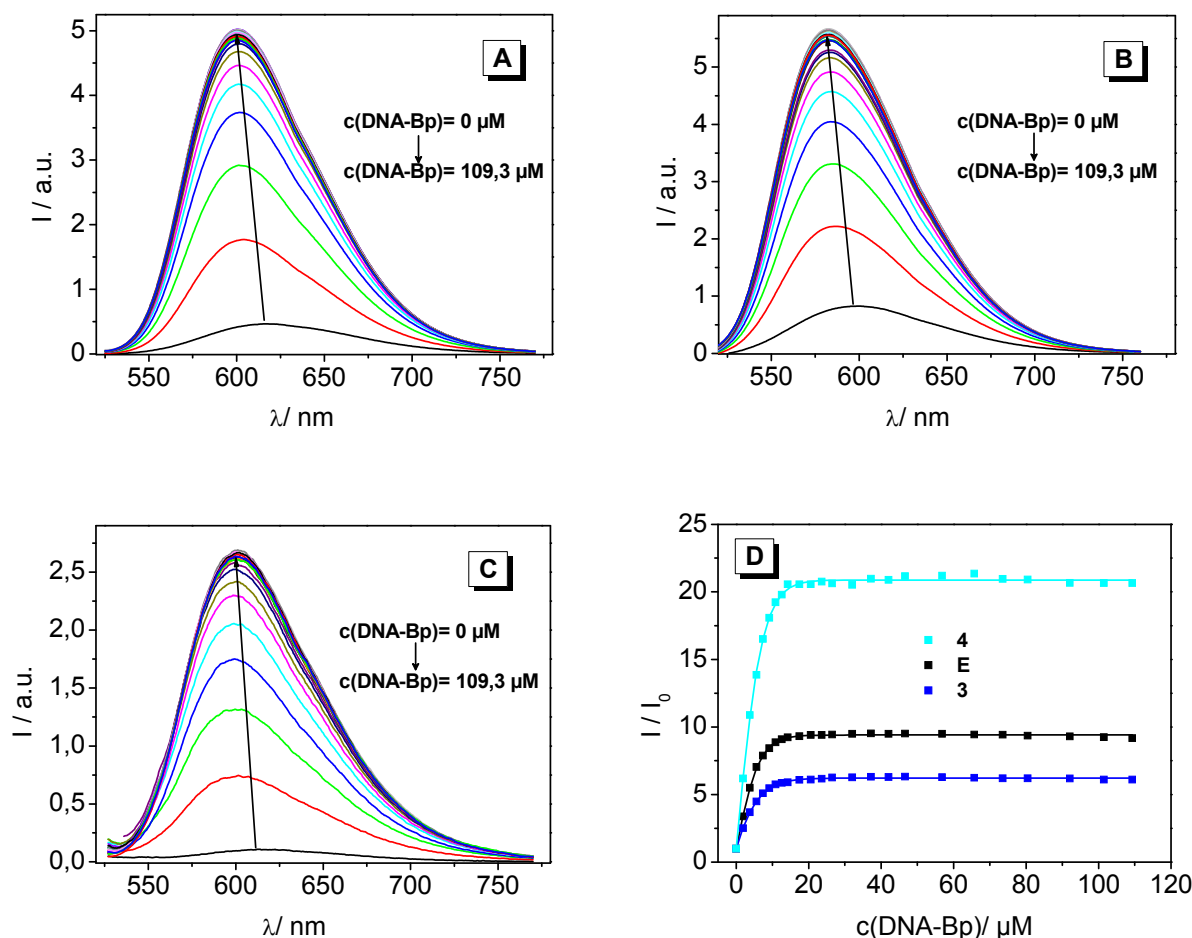


Abb. 4-18: Spektrofluorimetrische Titration der Phenanthridinium-Derivate ($c = 2,4 \mu\text{M}$) Ethidium (A), **3** (B) und **4** (C) mit **DNA1** in gepufferter wässriger Lösung (10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20°C). Die Pfeile zeigen die Änderung der Fluoreszenzintensität bei steigender DNA-Konzentration an. (D) Veränderung der Fluoreszenzintensität bei Titration der Farbstoffe mit **DNA1**.

Abb. 4-18 (A-C) zeigt die Änderung der Fluoreszenzspektren von Ethidium und den Phenanthridinium-Derivaten **3** und **4** bei Zugabe von **DNA1**. Die Intensität der Fluoreszenz steigt in Gegenwart von DNA bei allen drei Farbstoffen deutlich an, was mit einer hypsochromen Verschiebung des Fluoreszenzmaximums einhergeht. Nach Anregung bei $\lambda_{\text{EX}} = 510 \text{ nm}$ erhält man im Falle von Ethidium die charakteristische Verschiebung des Maximums von 615 nm für „freies“ Ethidium zu 601 nm für interkaliertes Ethidium.^[393, 394] Bei Verbindung **3** ($\lambda_{\text{EX}} = 492 \text{ nm}$) wurde eine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums von 599 nm auf 583 nm detektiert, das Emissionsmaximum von Farbstoff **4** ($\lambda_{\text{EX}} = 510 \text{ nm}$) wurde von 616 nm auf 601 nm verschoben.

Sowohl bei Ethidium als auch bei den beiden anderen Phenanthridinium-Derivaten **3** und **4** wurde ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet, der in Abb. 4-18 (D) in

Abhängigkeit von der DNA-Konzentration aufgetragen ist. Hier erkennt man deutlich, dass der relative Fluoreszenzanstieg im Falle von Farbstoff **4** am höchsten ist (ca. 21-fach), während der von Ethidium ungefähr halb so groß ist (ca. 10-fach). Mit einer ca. 7-fachen Erhöhung bei Zugabe von DNA weist der Farbstoff **3** den geringsten Fluoreszenzanstieg auf. Dementsprechend kann man auch hier einen deutlichen Zusammenhang zwischen dem elektronenschiebenden Charakter des Substituenten in Position 6 und dem Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von DNA beobachten. Bei Farbstoff **3** fehlt der schwach elektronenschiebende Phenylrest komplett, wohingegen die Verbindung **4** mit einem 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituenten einen zusätzlichen Elektronendonator besitzt. Je besser die Elektronen-Donor-Eigenschaften des Substituenten in Position 6 des Phenanthridinium-Grundgerüsts sind, desto stärker steigt die Fluoreszenzintensität in Gegenwart von DNA an, während zugleich die Fluoreszenz in wässriger Lösung stärker gelöscht wird. Diese Beobachtungen wurden als Grundlage für quantenmechanische Berechnungen genutzt und werden in Kapitel 4.7 ausführlicher diskutiert.

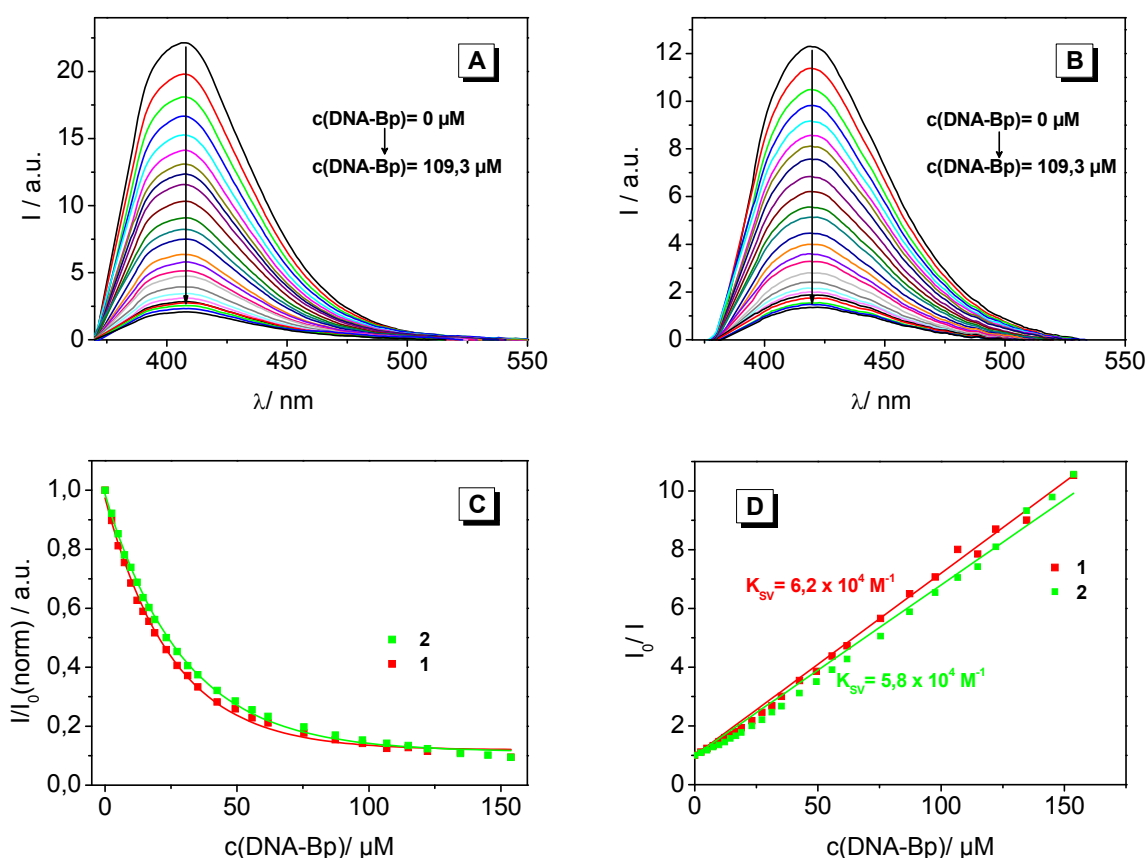


Abb. 4-19: Spektrofluorimetrische Titration der Phenanthridinium-Derivate ($c = 2,4 \mu\text{M}$) **1** (A) und **2** (B) mit **DNA1** in gepufferter wässriger Lösung (10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C). Die Pfeile kennzeichnen die Änderung der Fluoreszenzintensität bei steigender DNA-Konzentration. (C) Veränderung der Fluoreszenzintensität bei Titration der Farbstoffe mit **DNA1**. (D) Stern-Vollmer Auftragungen der spektrofluorimetrischen Titrations der Verbindungen **1** und **2** mit **DNA1**.

Die Ergebnisse der Fluoreszenztitrationen der Phenanthridinium-Derivate **1** und **2** mit **DNA1** unterscheiden sich deutlich von denen des Ethidiums. Nach Anregung bei $\lambda_{\text{Ex}} = 378$ nm bzw. $\lambda_{\text{Ex}} = 388$ nm bleibt die Lage des Emissionsmaximums beider Farbstoffe **1** ($\lambda_{\text{Em}} = 407$ nm) und **2** ($\lambda_{\text{Em}} = 420$ nm) bei Zugabe von DNA unverändert (vgl. Abb. 4-19, A und B). Außerdem erhält man in beiden Fällen eine starke Löschung der Fluoreszenz der Farbstoffe in Gegenwart von DNA (vgl. Abb. 4-19, C). Zur Quantifizierung der Löscheffizienz wurden die relativen Intensitäten I_0/I gegen die DNA-Konzentration (in Bp) aufgetragen (vgl. Abb. 4-19, D). Aus der Steigung der Geraden erhält man gemäß der *Stern-Vollmer*-Gleichung die Löschkonstante K_{SV} :

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot c(\text{DNA} - \text{Bp}) \quad \text{Gleichung 4-2}$$

Für beide Phenanthridinium-Derivate liegen die Löschkonstanten im Bereich von 10^4 M^{-1} (DNA-Bp), wobei die Effizienz der Fluoreszenzlöschung von Verbindung **1** mit einer Löschkonstanten $K_{SV} = 6,2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ geringfügig höher liegt als die des Farbstoffs **2** ($K_{SV} = 5,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$).

Die Fluoreszenzlöschung kann wahrscheinlich auf einen photoinduzierten Ladungstransfer von **1** bzw. **2** auf die DNA-Basen zurückgeführt werden. Aufgrund des hohen E_{00} -Werts von 3,2 eV (vgl. Kapitel 4.4) besitzen beide Verbindungen im angeregten Zustand sehr hohe Reduktionspotentiale (**1**: 1,9 eV; **2**: 1,8 eV). Guanin, als die am leichtesten zu oxidierende natürliche Base, weist ein Potential von $E_{\text{ox}}(\text{G}^{++}/\text{G}) = 1,3 \text{ V}$ gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) auf.^[156, 361] Verwendet man einen Wert von -0,63 V zur Umrechnung von der NHE auf die Ferrocen-Referenz,^[394] so ergibt sich das entsprechende Potential von Guanin zu 0,7 V. Aufgrund dieser Werte kann man davon ausgehen, dass beide Verbindungen **1** und **2** im angeregten Zustand in der Lage sind Guanin zu oxidieren, was eine Löschung der Fluoreszenz zur Folge hätte.

Ethidium und die Phenanthridinium-Derivate **3** und **4** weisen hingegen deutlich geringere Reduktionspotentiale (**E**: 0,7 eV; **3**: 0,6 eV; **4**: 0,6 eV) auf. Obwohl berücksichtigt werden muss, dass die erhaltenen Potentiale des angeregten Zustands nur eine Abschätzung darstellen, da Wechselwirkungen mit den DNA-Basen zu Schwankungen von ± 100 mV und mehr führen können,^[395] kann man davon ausgehen, dass die Verbindungen **3** und **4** auch im angeregten Zustand nicht in der Lage sind Guanin zu oxidieren. Im Falle von Ethidium kann eine Oxidation von Guanin jedoch aufgrund der ermittelten Potentiale nicht ausgeschlossen werden. Untersuchungen von *Huber et al.* mit kovalent gebundenem Ethidium zeigen eine schwache Löschung der Fluoreszenz in einer guanin- und cytosinreichen Umgebung, die in

einer adenin- und thyminreichen Umgebung nicht beobachtet werden konnte.^[102] Dies deutet auf die Bildung eines partiellen CT-Komplexes v. a. mit den elektronenreichen Guaninen hin. Die hier durchgeführten Titrationsexperimente mit **DNA1**, bei der das Verhältnis von G-C- zu A-T-Basenpaaren annähernd ausgeglichen ist, lassen keinen Rückschluss auf etwaigen Ladungstransfer von photoangeregtem Ethidium auf Guanin zu.

4.6. Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der Viskositätsabhängigkeit

Die Viskosität eines Lösungsmittels beeinflusst die Fluoreszenzeigenschaften von Farbstoffen, da viskosere Medien zu längeren Reorgansierungszeiten der umgebenden Lösungsmittelmoleküle führen, wodurch die Entpopularisierung des angeregten Zustands beeinflusst wird. Um weitere Informationen bezüglich des Mechanismus der strahlungslosen Desaktivierung von Ethidium und der Phenanthridinium-Derivate **1-4** zu erhalten, wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenzeigenschaften von der Viskosität des Mediums bestimmt. Generell kann die Viskosität des Mediums auf zwei verschiedene Arten systematisch verändert werden: zum einen durch Mischungen von Lösungsmitteln mit unterschiedlicher Viskosität, zum anderen durch Lösungsmittel, deren Viskosität sich temperaturabhängig stark verändert.

4.6.1. Messungen in reinem Glycerin bei verschiedenen Temperaturen

Zur Untersuchung der Viskositätsabhängigkeit der spektroskopischen Eigenschaften von Farbstoffen wird häufig Glycerin als Lösungsmittel verwendet, da sich die Viskosität von Glycerin in Abhängigkeit von der Temperatur sehr stark verändert: bei einer Erhöhung der Temperatur von 0 °C auf 100 °C sinkt die Viskosität nicht-linear von 12070 cP auf 14,8 cP.^[396]

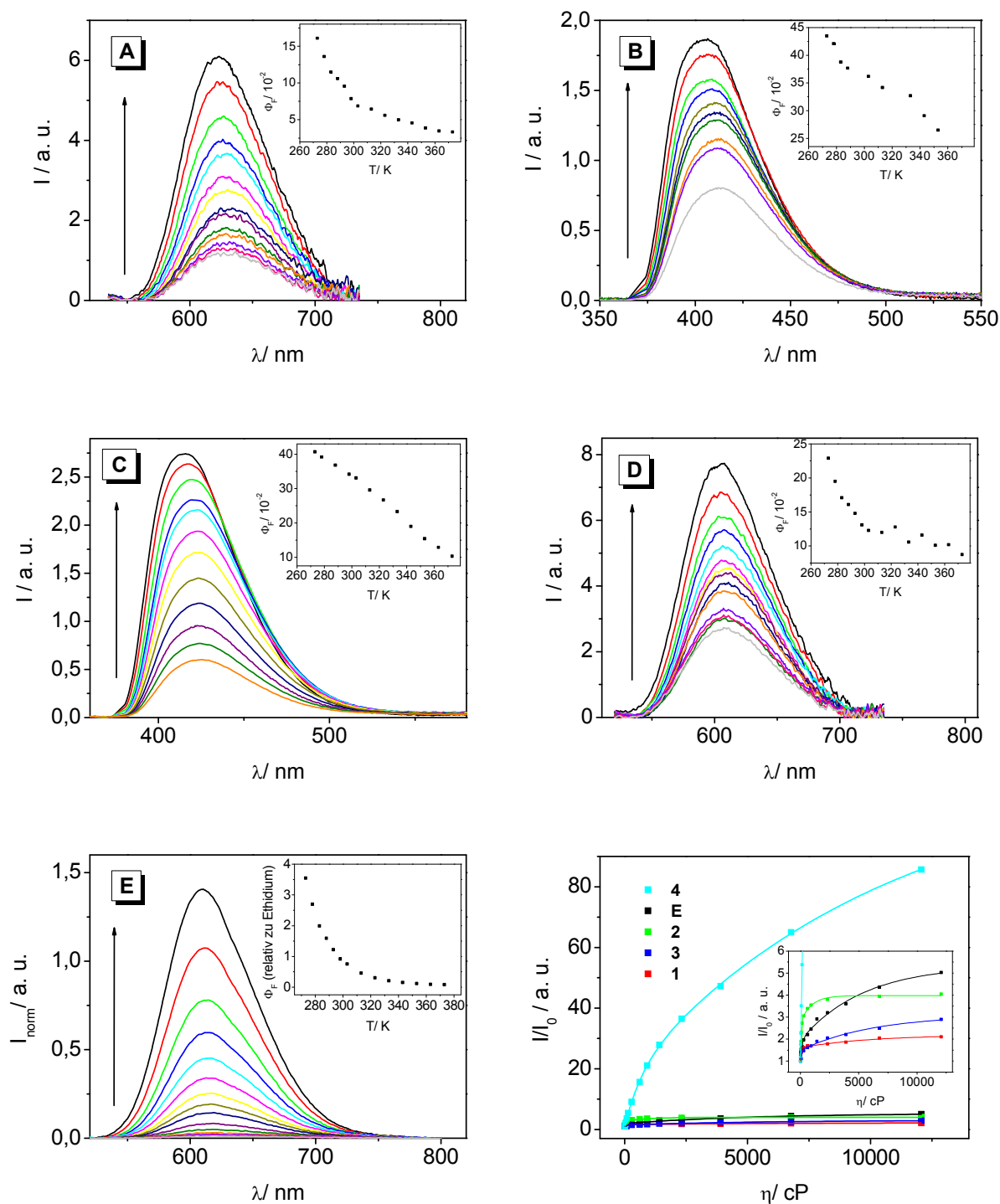


Abb. 4-20: Emissionsspektren der Phenanthridinium-Derivate Ethidium (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D) und 4 (E) in Glycerin ($c = 10 \mu\text{M}$) bei verschiedenen Temperaturen (0°C – 100°C). Die Pfeile kennzeichnen die Änderung der Fluoreszenzbanden bei sinkender Temperatur. Die eingefügten Graphen zeigen die Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute in Abhängigkeit von der Temperatur. (Quantenausbeuten von 1 und 2 wurden mit Chininsulfat in $1 \text{ M H}_2\text{SO}_4$ ($\Phi_F = 0,546$)^[376] als Standard bestimmt, zur Quantenausbeutebestimmung von E und 3 diente Rhodamin 101 in Ethanol ($\Phi_F = 1,0$)^[376] als Standard. Quantenausbeuten von 4 wurden relativ zu einer wässrigen Ethidumbromid-Lösung (in 10 mM NaP_i -Puffer, $\text{pH } 7$, 20°C) gemessen.) Veränderung der Fluoreszenzintensität der Phenanthridinium-Derivate Ethidium und 1-4 bei steigender Viskosität (F).

Auf die Absorptionseigenschaften der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** hat die Temperaturerhöhung kaum Auswirkungen: man erhält für alle Verbindungen eine Blauverschiebung der Absorption von ca. 2-3 nm bei einer Erhöhung der Temperatur von 0 °C auf 100 °C (Daten nicht gezeigt). Abb. 4-20 zeigt den Effekt der Viskositätsänderung auf die Fluoreszenz von Ethidium (**A**), **1** (**B**), **2** (**C**), **3** (**D**) und **4** (**E**). Die Emission aller untersuchten Derivate steigt mit sinkender Temperatur, und somit mit steigender Viskosität an, allerdings in unterschiedlich starkem Ausmaß. Die geringsten Auswirkungen weist das Fluoreszenzverhalten der Verbindungen **1** und **3** mit einem ca. 2- bzw. 3-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität (vgl. Abb. 4-20, F) und einer Blauverschiebung der Fluoreszenzmaxima von 7 nm bzw. 5 nm auf. Die entsprechenden phenylsubstituierten Derivate **2** und **E** zeigen eine Blauverschiebung der Emissionsmaxima von 9 nm und einen ca. 4- bzw. 5-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Erhöhung der Viskosität von 14,8 cP auf 12070 cP, die Quantenausbeuten der 6-Methyl-Verbindungen **1** und **3** liegen allerdings auch bei 0 °C noch höher. Auffällig ist außerdem, dass die Fluoreszenz von **1** und **2** im mäßig viskosen Bereich (bis ca. 1000 cP bzw. ca. 4000 cP) deutlich steiler ansteigt als die der entsprechenden Diaminoderivate **3** und **E**. Im Vergleich zu wässriger Pufferlösung ändert sich die Quantenausbeute von Verbindung **1** in Glycerin bei 20 °C kaum, die von **2** liegt um lediglich 50 % höher, während die Quantenausbeuten von **E** und **3** in Glycerin bei 20 °C, verglichen mit wässriger Pufferlösung, auf das ca. 8-fache ansteigen. Den größten Einfluss hat die Viskosität des Mediums allerdings auf Verbindung **4**: Hier erhöht sich die Quantenausbeute im Vergleich zur wässrigen Pufferlösung auf das ca. 170-fache, was dazu führt, dass die Quantenausbeute von **4** in Glycerin bei 20 °C ($\Phi_F \approx 2\%$; vgl. Abb. 4-20, **E**, eingefügter Graph) die von Ethidium in wässriger Lösung ($\Phi_F \approx 1\%$) übersteigt. Die Variation der Viskosität von 14,8 cP auf 12070 cP führt zu einer Blauverschiebung des Emissionsmaximums von **4** um 14 nm, was mit einem mehr als 80-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität einhergeht (vgl. Abb. 4-20, F).

4.6.2. Messungen in verschiedenen Glycerin-Wasser-Mischungen

Eine weitere Möglichkeit zur Veränderung der Viskosität eines Mediums stellt, wie bereits erwähnt, die Mischung von Lösungsmitteln unterschiedlicher Viskosität dar. Hier wurden dazu Glycerin-Wasser-Mischungen verwendet, da damit ein weiter Bereich an Viskositäten abgedeckt werden kann ($\eta = 1,005$ cP in Wasser, $\eta = 1499$ cP in Glycerin bei 20 °C), der auch geringere Viskositäten als die Messungen im reinem Glycerin (vgl. Kapitel 4.6.1) erlaubt.

(Heizt man reines Glycerin auf ca. 170 °C erhält man ähnlich geringe Viskositäten. Ein Aufheizen über 100 °C war an der hier verwendeten Apparatur allerdings nicht möglich.) Die Abhängigkeit der Viskositäten dieser Mischungen von ihrem jeweiligen Gehalt an Wasser bzw. Glycerin ist sehr genau untersucht worden.^[396] Außerdem handelt es sich sowohl bei Wasser als auch bei Glycerin um protische Lösungsmittel mit vergleichbarer Polarität ($E_T(30) = 63,1$ für Wasser, $E_T(30) = 57,0$ für Glycerin),^[67] sodass eine Polaritätsänderung bei Mischung dieser Lösungsmittel vernachlässigt werden kann.

In Abb. 4-21 sind exemplarisch für die Didesamino-Verbindungen **1** und **2** die Absorptions- (A) und Fluoreszenzspektren (B) von Derivat **2** in verschiedenen Glycerin-Wasser-Mischung dargestellt. Eine eindeutige Verschiebung der Absorptionsbanden bei steigendem Glycerin-Anteil ist nicht zu erkennen, die Fluoreszenzspektren werden um 2- 3 nm in den langwelligen Bereich verschoben. Die Fluoreszenzquantenausbeute von **1** bleibt auch bei steigendem Glycerin-Gehalt annähernd konstant, während sich die von **2** auf das ca. 1,6-fache erhöht und damit im gleichen Bereich wie die von **1** liegt. Stellvertretend für die Phenanthridinium-Derivate **E**, **3** und **4** sind in Abb. 4-21 die Absorptions- (C) und Fluoreszenzspektren (D) von Ethidium in verschiedenen Glycerin-Wasser-Mischungen gezeigt. Man erkennt eine Rotverschiebung der Absorptionsbanden von ca. 30 nm bei steigendem Glycerin-Anteil sowie einen deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität und der -quantenausbeute (ca. 7-fach), der mit einer geringen Rotverschiebung der Emissionsspektren von ca. 4 nm einhergeht. Für Verbindung **3** wurden ähnliche Ergebnisse gefunden: Auch hier verschieben sich die Absorptions- und Fluoreszenzspektren um die gleichen Werte in den langwelligen Bereich und die Quantenausbeute steigt auf das ca. 7-fache an. Verbindung **4** zeigt ähnliche Verschiebungen der Absorptions- und der Fluoreszenzspektren wie die beiden anderen Diamino-Derivate. Der Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute bei steigendem Glycerin-Anteil ist hier allerdings deutlich stärker ausgeprägt, obwohl nur Daten zwischen 60 % und 100 % Glycerin-Gehalt zur Auswertung herangezogen werden konnten, da die Fluoreszenz von Verbindung **4** in weniger als 60 % Glycerin-Anteil bei der Quantenausbeutebestimmung mit Rhodamin 101 als Standard unterhalb des Detektionslimits lag. Um die Ergebnisse aller Phenanthridinium-Derivate in Glycerin-Wasser-Mischungen trotzdem vergleichbar zu machen, zeigt Abb. 4-21 (E) die Veränderung der relativen Quantenausbeuten bezogen auf die Quantenausbeute in reinem Glycerin bei sinkender Viskosität. In dem Bereich zwischen 60 % und 100 % Glycerin-Gehalt (10,96 cP bis 1499 cP) steigt die Fluoreszenzquantenausbeute auf das ca. 40-fache an.

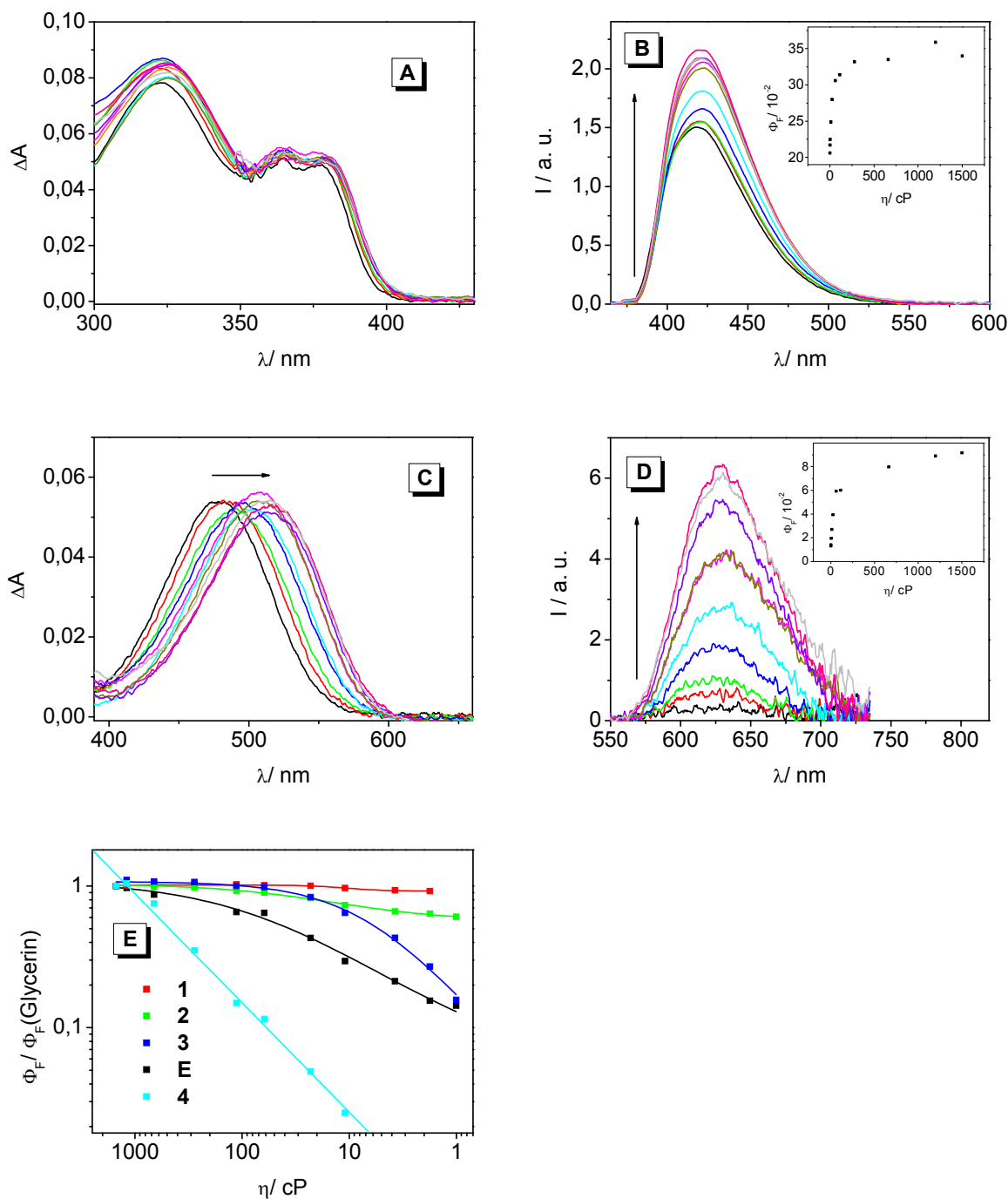


Abb. 4-21: Absorptions- und Emissionsspektren der Phenanthridinium-Derivate (c = 10 μ M) Ethidium (A, B) und 2 (C, D) in Glycerin-Wasser-Mischungen (0 % bis 100 % Glycerin) bei 20 °C. Die Pfeile kennzeichnen die Änderung der Absorptions- und Fluoreszenzbanden bei steigendem Glycerin-Anteil. Die eingefügten Graphen zeigen die Änderung der Fluoreszenzquantenausbeute in Abhängigkeit von der Viskosität. (Quantenausbeuten von 1 und 2 wurden mit Chininsulfat in 1 M H_2SO_4 ($\Phi_F = 0,546$)^[376] als Standard bestimmt, zur Quantenausbeutebestimmung von E, 3 und 4 diente Rhodamin 101 in Ethanol ($\Phi_F = 1,0$)^[376] als Standard.) Veränderung der Quantenausbeuten der Phenanthridinium-Derivate Ethidium und 1-4 relativ zur ihrer Quantenausbeute in reinem Glycerin bei steigender Viskosität (E).

Interessant ist außerdem, dass die Quantenausbeute von Verbindung **3** bei Erhöhung des Glycerin-Anteils zunächst stärker ansteigt als die von Ethidium. Ab einem Gehalt von 85 % Glycerin bleibt die Fluoreszenz von **3** jedoch annähernd konstant, während die Quantenausbeute von Ethidium mit steigender Viskosität weiter ansteigt. Das steht im Einklang mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.6.1 wonach der Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute von Ethidium in stärker viskoser Umgebung (niedriger Temperatur) höher ist als der von Verbindung **3**.

4.6.3. Bestimmung der Arrhenius Parameter

Eine ähnlich starke Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Viskosität des Mediums wie bei Verbindung **4** wurde auch bei zahlreichen anderen Farbstoffen beobachtet, deren Konformation sich im angeregten Zustand ändert. Dabei handelt es sich beispielsweise um *N*-Aryl-9-aminoacridizinium Farbstoffe,^[383] phenylsubstituierte Heterozyklen wie 3,3-Dimethyl-2-phenylindolenin^[397] oder Donor-Akzeptor-Systeme, die nach Anregung einen verdrehten intramolekularen Ladungsübertragungszustand (TICT-Zustand) bilden, wie Di- oder Triphenylmethan-Verbindungen^[71] oder donormodifizierte Rhodamine.^[75] Aufgrund der Parallelen zu den erwähnten Verbindungen sollte auch für **E**, **2** und v. a. für **4** die Möglichkeit einer strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustands aufgrund von Rotationen des Phenyl- bzw. des 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituenten in Betracht gezogen und untersucht werden.

In mäßig bis hoch viskosen Lösungen haben freie-Volumen-Effekte (*free-volume effects*) deutlich größere Auswirkungen auf die interne Rotation (*torsional relaxation*) der Probe als die Volumenviskosität (*bulk viscosity*) der Lösungen.^[64, 398] Die *Doolittle*-Gleichung beschreibt einen empirischen Zusammenhang zwischen der Viskosität η und des freien Volumens V_0 :

$$\eta = \eta_0 \exp\left(\frac{V_0}{V_f}\right) \quad \text{Gleichung 4-3}$$

η_0 stellt dabei eine Konstante dar, bei V_f handelt es sich um das van-der-Waals-Volumen des Lösungsmittels. Unter der Voraussetzung, dass die intrinsische Lebenszeit des strahlenden Übergangs sowohl temperatur- als auch viskositätsunabhängig ist, kann die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F aus den Ratenkonstanten der strahlenden (k_r) und der strahlungslosen Prozesse (k_{nr}) berechnet werden:

$$\Phi_F = \frac{k_{nr}}{k_r + k_{nr}} \quad \text{Gleichung 4-4}$$

Für mäßig bis hoch viskose Lösungsmittel wurde ein empirischer Zusammenhang zwischen der Ratenkonstante für strahlungslose Prozesse (k_{nr}) und dem Verhältnis des *van-der-Waals*-Volumens zum freien Volumen gefunden:

$$k_{nr} = k_{nr}^0 \exp\left(-x \cdot \frac{V_0}{V_f}\right) \quad \text{Gleichung 4-5}$$

Bei k_{nr}^0 handelt es sich dabei um die Reorientierungsrate in Abwesenheit eines Lösungsmittelkäfigs, bei x um eine Konstante, die von der Geometrie und der Größe der Probe abhängt. Durch Kombination dieser drei Gleichungen und unter der Berücksichtigung, dass die Veränderung der Viskosität durch Variation der Temperatur T erzielt wurde, erhält man einen empirischen Zusammenhang zwischen der Quantenausbeute Φ_F des Farbstoffs und der Viskosität η des Mediums:^[383, 398, 399]

$$\frac{\Phi_F}{1 - \Phi_F} = A \cdot (\eta / T)^x \quad \text{Gleichung 4-6}$$

In der Konstante A sind dabei alle Konstanten der drei Gleichungen zusammengefasst. Aus einer doppeltlogarithmischen Auftragung erhält man x , wobei im Allgemeinen $x < 1$ ist, was den Einfluss der effektiven Viskosität des Mediums bestätigt, die aufgrund der freien-Volumen-Effekte (*free-volume effects*) geringer ist als die Volumenviskosität (*bulk viscosity*) der Lösungen.

Wird eine Änderung der Viskosität ohne Variation der Temperatur z. B. durch Verwendung verschiedener Lösungsmittel oder Lösungsmittelmischungen herbeigeführt und besitzen die Farbstoffe eine geringe Quantenausbeute ($\Phi_F \ll 1$), kann Gleichung 4-6 zur *Förster-Hoffmann*-Gleichung vereinfacht werden:^[64, 70]

$$\Phi_F = C \cdot \eta^k \quad \text{Gleichung 4-7}$$

Nach der Theorie von *Förster* und *Hoffmann*^[70] wird für die Rotation einer Phenylgruppe im angeregten Zustand in viskosen Medien ein Wert von $k = 2/3$ erwartet, was experimentell für eine Vielzahl von Farbstoffen bestätigt werden konnte.^[70, 71, 383, 397]

Betrachtet man die Fluoreszenzquantenausbeuten von **E**, **2** und **4** in Abhängigkeit von der Viskosität des Mediums, erhält man für alle drei Phenanthridinium-Derivate in Glycerin-Wasser-Mischungen bei 20 °C einen linearen Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz-

quantenausbeute und der Viskosität des Mediums (vgl. Abb. 4-22, A). Für Verbindung **4** konnten die Quantenausbeuten mit Rhodamin 101 als Standard erst ab einem Gehalt von mindestens 60 % Glycerin bestimmt werden, da die Fluoreszenz in weniger viskosen Lösungen unterhalb der Detektionsgrenze lag. Daher wurden für Verbindung **4** nur Daten zwischen 60 % und 100 % Glycerin zur Auswertung herangezogen. Die aus den Ausgleichsgeraden erhaltenen k -Werte für die Phenanthridinium-Derivate **E**, **2** und **4** unterscheiden sich deutlich: während die Verbindungen **E** und **2** mit $k=0,28$ bzw. $k=0,08$ deutlich vom Torsionsmodell von Förster und Hoffmann ($k=\frac{2}{3}$) abweichen, erfüllt Verbindung **4** mit $k=0,77$ in verschiedenen Glycerin-Wasser-Mischungen näherungsweise diese Bedingung.

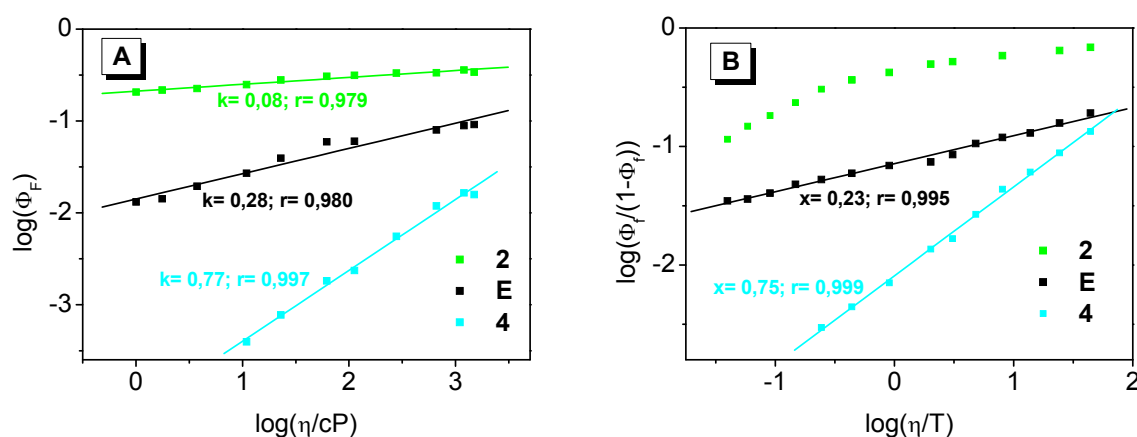


Abb. 4-22: Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten von **E**, **2** und **4** in Glycerin-Wasser-Mischungen bei 20 °C (A). Auftragung der Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenzquantenausbeuten von **E**, **2** und **4** in Glycerin bei unterschiedlichen Temperaturen (0 °C bis 100 °C) in Form von $\log(\Phi_F/(1-\Phi_F))$ gegen $\log(\eta/T)$ (B).

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen der Phenanthridinium-Derivate **E**, **2** und **4** in Glycerin bei unterschiedlichen Temperaturen zeigen einen linearen Zusammenhang zwischen $\log(\Phi_F/(1-\Phi_F))$ und $\log(\eta/T)$ für Ethidium und **4**, für Verbindung **2** konnte kein eindeutiger linearer Zusammenhang gefunden werden (vgl. Abb. 4-22, B). Zur Bestimmung der Quantenausbeuten von Ethidium und **4** wurde Rhodamin 101 als Standard verwendet. Da die Quantenausbeute von **4** sehr gering ist, lag die Fluoreszenzintensität ab einer Temperatur von 343 K unterhalb des Detektionslimits. Daher wurden für Verbindung **4** nur Daten zwischen 273 K und 333 K zur Auswertung verwendet. Die Werte der Exponenten x für Ethidium ($x=0,23$) und Verbindung **4** ($x=0,75$) stimmen gut mit den Ergebnissen der Glycerin-Wasser-Mischungen bei konstanter Temperatur überein, Verbindung **4** erfüllt auch hier

näherungsweise das Modell von *Förster* und *Hoffmann*. Das bekräftigt die Vermutung, dass die Rotation des 4-*N,N*-Diethylanilino-Substituenten zur Löschung der Fluoreszenz von Verbindung **4** beiträgt.

Die Ergebnisse der temperaturabhängigen Fluoreszenzquantenausbeutemessungen der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** in Glycerin können genutzt werden, um mittels *Arrhenius*-Auftragungen die Aktivierungsenergie E_A der strahlungslosen Desaktivierung des angeregten Zustands zu ermitteln:

$$k_{nr} = A \cdot e^{\frac{-E_A}{RT}} \quad \text{Gleichung 4-8}$$

Dazu wird die Rate der strahlenden (k_r) und der strahlungslosen Desaktivierung (k_{nr}) des angeregten Zustands benötigt, die aus der Fluoreszenzlebenszeit τ_F eines Moleküls und seiner Quantenausbeute Φ_F berechnet werden kann.^[69]

$$k_r = \frac{\Phi_F}{\tau_F} \quad \text{Gleichung 4-9}$$

$$k_{nr} = \frac{1}{\tau_F} - k_r \quad \text{Gleichung 4-10}$$

Da die erforderlichen Geräte zur Messung der Fluoreszenzlebenszeiten τ_F der Phenanthridinium-Derivate bei unterschiedlichen Temperaturen nicht zur Verfügung standen, wurden die „natürlichen“ Fluoreszenzlebenszeiten τ_0 , die eine obere Grenze der Fluoreszenzlebensdauern darstellen, und die dazugehörigen Raten k_r aus den Absorptions- und Emissionsspektren entsprechend der Gleichung von *Strickler* und *Berg* (vgl. Kapitel 3.2.4) abgeschätzt.^[87]

$$k_r = \frac{1}{\tau_0} = 2,880 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 \cdot \left\langle \tilde{\nu}_F^{-3} \right\rangle_{Av}^{-1} \cdot \frac{g_l}{g_u} \int \varepsilon(\tilde{\nu}) d \ln \tilde{\nu} \quad \text{Gleichung 4-11}$$

Die Fluoreszenzlebenszeit τ_F konnte dann mit Hilfe der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F ermittelt werden.^[87]

$$\tau_F = \Phi_F \cdot \tau_0 \quad \text{Gleichung 4-12}$$

Die berechneten Daten der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4**, einschließlich der Raten der strahlenden (k_r) und der strahlungslosen Desaktivierung (k_{nr}) des angeregten Zustands, befinden sich in Kapitel 7.3.4 in den Tabellen 7-8 bis 7-12. Für Verbindung **4** wurden

aufgrund ihrer geringen Fluoreszenzquantenausbeute erneut nur Werte zwischen 273 K und 333 K berücksichtigt.

Die berechneten Ratenkonstanten der strahlenden Relaxation des angeregten Zustands k_r liegen für alle untersuchten Phenanthridinium-Derivate in der gleichen Größenordnung, zwischen $2 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ und $5 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$. Außerdem unterliegen die k_r -Werte Schwankungen im Bereich von ca. 6 %, eine Korrelation mit der Temperatur konnte jedoch nicht gefunden werden. Aufgrund der Annahme, dass die k_r -Werte temperaturunabhängig sind, wurde der Mittelwert aus allen Messungen des jeweiligen Phenanthridinium-Derivats gebildet und daraus die restlichen Parameter berechnet.

Vergleicht man die abgeschätzten Geschwindigkeitskonstanten von Ethidium ($k = 0,15 \text{ ns}^{-1}$ bei 0°C , $k = 0,30 \text{ ns}^{-1}$ bei 25°C) bei 0°C und bei 25°C in Glycerin mit den Ergebnissen von *Sommer et al.* ($k = 0,17 \text{ ns}^{-1}$ bei 0°C , $k = 0,28 \text{ ns}^{-1}$ bei 25°C),^[400] so findet man eine gute Übereinstimmung mit Abweichungen von 12 % bzw. 7 %, die allerdings noch im Toleranzbereich der Messung liegen. Die hier nach *Strickler* und *Berg* abgeschätzte Fluoreszenzlebenszeit von Ethidium ($\tau_F = 4,0 \text{ ns}$) in Glycerin bei 20°C liegt in der gleichen Größenordnung wie die von *Olmsted et al.* gemessene Lebenszeit ($\tau_F = 5,9 \text{ ns}$),^[256] weicht davon jedoch um 32 % ab. Berücksichtigt man, dass die Fehler, die bei der Bestimmung der Quantenausbeute Φ_F und der Rate der strahlenden Relaxation k_r hier mit eingehen, wird diese Abweichung zumindest teilweise relativiert. Die Anwendung der *Strickler-Berg*-Gleichung zur Abschätzung der Aktivierungsenergien der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** ist dennoch gerechtfertigt, v. a. wenn man bedenkt, dass ein Vergleich der Werte untereinander, die ähnlich fehlerbehaftet sein sollten, im Vordergrund steht.

Zur Bestimmung der *Arrhenius*-Parameter der strahlungslosen Relaxation der Phenanthridinium-Derivate **E** und **1-4** wurde $\ln(k_{nr})$ gegen $1/T$ aufgetragen (vgl. Abb. 4-23). Die Werte von **1** und **4** konnten unter Verwendung einer Ausgleichsgeraden angepasst werden, für **E**, **2** und **3** wurden zwei Ausgleichsgeraden benötigt. Die daraus erhaltenen Werte für die Aktivierungsenergien E_A und präexponentiellen Faktoren A aller Phenanthridinium-Derivate sind in Tabelle 4-6 zusammengefasst.

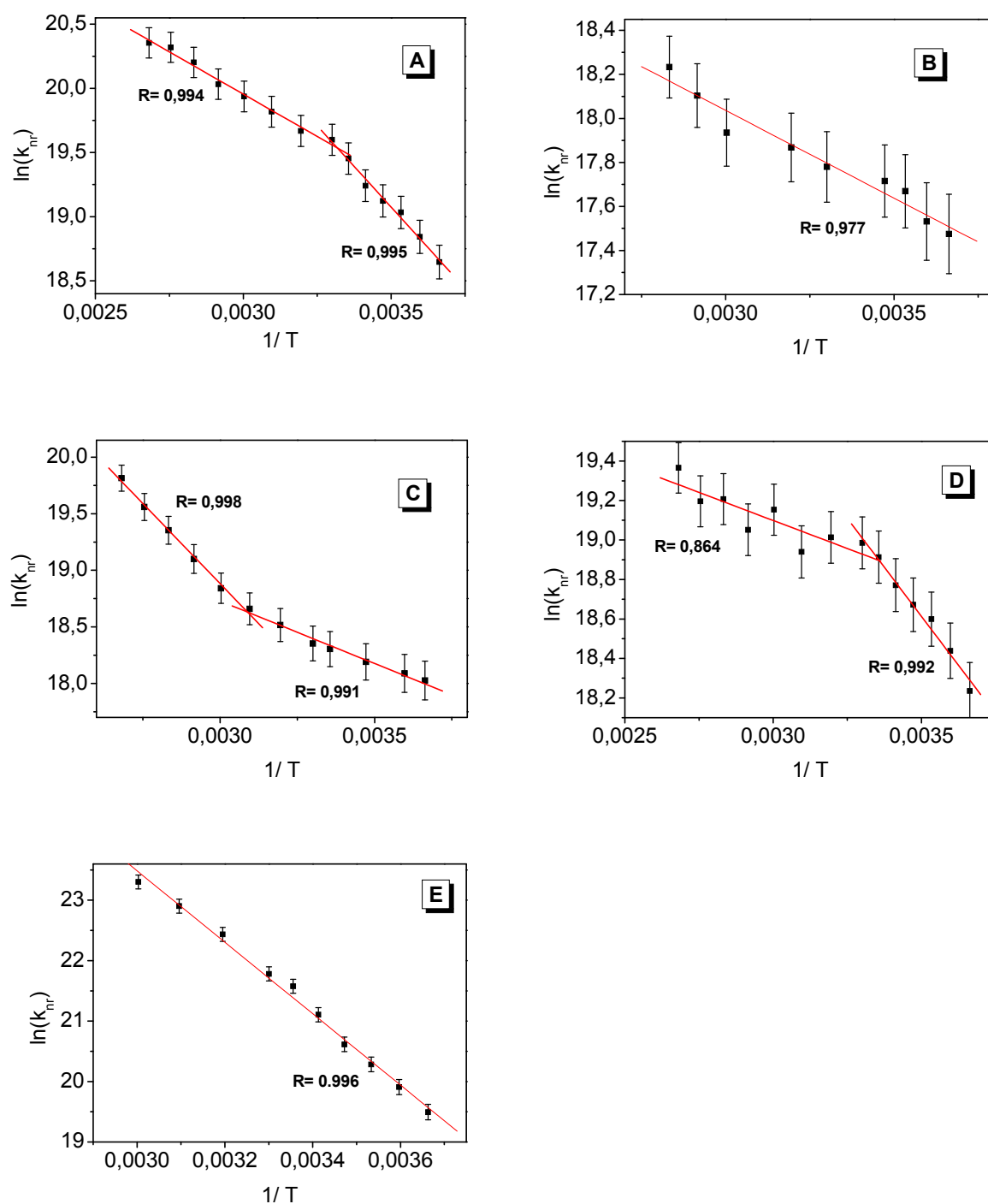


Abb. 4-23: *Arrhenius*-Auftragungen zur Bestimmung der Aktivierungsenergie E_A und des präexponentiellen Faktors A der strahlungslosen Relaxation der Phenanthridinium-Derivate ($c = 10 \mu\text{M}$) Ethidium (A), 1 (B), 2 (C), 3 (D) und 4 (E). Die Linien stellen die besten Ausgleichsgeraden dar.

Tabelle 4-6: Aktivierungsenergien E_A und präexponentielle Faktoren A der strahlungslosen Prozesse von **E** und **1-4** in Glycerin aus *Arrhenius*-Auftragungen (siehe Kapitel 3.2.4).

	$E_{A1}/ \text{kJ mol}^{-1}$	$A1/ \text{s}^{-1}$	$E_{A2}/ \text{kJ mol}^{-1}$	$A2/ \text{s}^{-1}$
E	21,1	$1,37 \cdot 10^{12}$	11,0	$2,43 \cdot 10^{10}$
1	6,63	$7,44 \cdot 10^8$	-	-
2	9,19	$3,74 \cdot 10^9$	23,5	$7,74 \cdot 10^{11}$
3	16,5	$1,27 \cdot 10^{11}$	4,73	$1,08 \cdot 10^9$
4	49,1	$7,93 \cdot 10^{17}$	-	-

Die beiden Aktivierungsenergien von Verbindung **2** liegen in der gleichen Größenordnung wie die von Ethidium, allerdings in unterschiedlichen Temperatur- und damit Viskositätsbereichen. Während Ethidium, ebenso wie Verbindung **3**, bei höheren Viskositäten die höhere Aktivierungsenergie aufweist, ist die Aktivierungsenergie von **2** im weniger viskosen Bereich höher. Die Aktivierungsenergie von **1** ist mit der von Verbindung **3** bei niedriger Viskosität vergleichbar. Die mit Abstand höchste Aktivierungsenergie weist Verbindung **4** mit einem Wert von $49,1 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ auf.

Aktivierungsenergien im Bereich zwischen $37 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ und $47 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ sind typisch für die Rotation einer (substituierten) Phenylgruppe im angeregten Zustand, wie u. a. Ergebnisse von *Vogel et al.* [72] für Triphenylmethan-Farbstoffe, *Granzhan* [398] für 9-donorsubstituierte Acridizinium-Verbindungen, *Belletête et al.* [397] für Phenylindol-Derivate und *Loutfy et al.* [399] für 4-*N,N*-Dialkylaminobenzylidenmalonnitrile gezeigt haben. Wegen der guten Übereinstimmung mit dem Torsionsmodell nach *Förster* und *Hoffmann* und der hohen Aktivierungsenergie von **4** kann man auch unter Berücksichtigung des Fehlers, den hier die Abschätzung nach *Strickler-Berg* möglicherweise mit sich bringt, davon ausgehen, dass die Rotation des 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituenten im angeregten Zustand bei der strahlungslosen Relaxation von Verbindung **4** eine wichtige Rolle spielt. Dies wurde mittels quantenmechanischer Berechnungen (vgl. Kapitel 4.7) noch genauer untersucht.

Der höhere Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute von Ethidium und **2** im Vergleich zu den entsprechenden Desphenyl-Verbindungen **3** und **1** bei steigender Viskosität (vgl. Kapitel 4.6.1 und 4.6.2) deutet grundsätzlich darauf hin, dass eine Rotation des Phenylrings an der strahlungslosen Relaxation von **E** und **2** beteiligt ist, auch wenn die Auftragungen nach *Förster* und *Hoffmann* und die relativ niedrigen Aktivierungsenergien eher dagegen sprechen. *Sommer et al.* [400] untersuchten Ethidium und **3** in Glycerin mittels zeitaufgelöster transienter Fluoreszenzmessung und fanden neben der bekannten Zeitkomponente im ns-Bereich zusätzlich eine schnellere Zeitkomponente ($\sim 100 \text{ ps}$), die sich aus einer Rotverschiebung des

Fluoreszenzspektrums in Abhängigkeit von der Zeit ergibt. Die Aktivierungsenergie, die sie für die Rotverschiebung der Ethidiumfluoreszenz bestimmten ($\sim 4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ entspricht $\sim 17 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), liegt auch unter Berücksichtigung des Fehlers durch die Näherung nach *Strickler-Berg* in einer ähnlichen Größenordnung wie die hier für **E** und **3** in einem vergleichbaren Temperaturbereich bestimmte Aktivierungsenergie, wobei beachtet werden sollte, dass ein Einfluss weiterer Effekte, die eine Fluoreszenzlöschung von **E** und **3** bewirken, auf die hier erhaltenen Aktivierungsenergien nicht ausgeschlossen werden kann. Trotz dieser verhältnismäßig niedrigen Aktivierungsenergie führten *Sommer et al.* den schnellen, nicht-exponentiell verlaufenden Zerfall auf eine intramolekulare Relaxation durch Rotation der Phenyl- und Aminogruppen bei Ethidium bzw. der Aminogruppen bei Verbindung **3** im angeregten Zustand zurück. Für die Rotation der Aminogruppen im angeregten Zustand nahmen sie ähnliche Relaxationszeiten an wie für die Phenylrotation, da der Größenvorteil der Aminogruppen durch ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen wieder relativiert wird, was auch die um lediglich 25 % niedrigere Aktivierungsenergie von Verbindung **3** in den hier beschriebenen Experimenten, zumindest teilweise, erklärt. Sie begründeten die Annahme einer intramolekularen Rotation trotz der vergleichsweise geringen Viskositätsabhängigkeit der Fluoreszenz damit, dass es sich dabei weniger um einen aktivierten als viel mehr um einen erzwungenen Prozess handelt, der durch die Verdrillung der Substituenten gegen das viskose Lösungsmittel verursacht wird. Da dieser Prozess deutlich schneller verläuft ($\sim 100 \text{ ps}$), als die dielektrische Relaxation von Glycerin ($\sim 10\text{-}20 \text{ ns}$ bei 0°C), wird er nicht durch freie-Volumen-Effekte oder die dynamische Viskosität des Lösungsmittels bestimmt, sondern durch den Hoch-Frequenz-Anteil (*high-frequency component*) der Reibungskraft des viskosen Lösungsmittels, der deutlich weniger temperaturabhängig ist, als die Gesamtviskosität. Die Tatsache, dass *Sommer et al.* für Ethidium in wässriger Lösung keine Rotverschiebung der Fluoreszenz detektieren konnten, führten sie darauf zurück, dass die Rotation des Phenylsubstituenten durch niederviskose Medien wie Wasser nicht behindert wird, wodurch eine mögliche Verschiebung auf einer so kurzen Zeitskala erfolgen würde, dass sie diese in ihren Experimenten nicht auflösen konnten. Obwohl Ethidium in Glycerin dem *Förster-Hoffmann*-Torsionsmodell nicht genügt und eine vergleichsweise geringe Aktivierungsenergie aufweist, kann man aus den hier vorgestellten Experimenten und den Ergebnissen von *Sommer et al.* davon ausgehen, dass eine Rotation des Phenylsubstituenten an der strahlungslosen Relaxation von Ethidium beteiligt ist. Dieser Prozess scheint jedoch nicht hauptausschlaggebend für die Löschung der Fluoreszenz in polaren Lösungsmitteln zu sein.

4.7. Quantenmechanische Berechnungen

Wie bereits in Kapitel 3.5 und 4.1 erwähnt, sind die Ursachen für den signifikanten Fluoreszenzanstieg von Ethidiumbromid bei Interkalation in DNA bis heute nicht komplett aufgeklärt. Die experimentellen Daten der Fluoreszenztitrationen zeigen, dass der Fluoreszenzanstieg in der Reihenfolge $3 < \mathbf{E} < \mathbf{4}$ bei Interkalation in DNA zunimmt (vgl. Kapitel 4.5.2). Zusammen mit den Ergebnissen der Absorptions- und Fluoreszenzmessungen in verschiedenen Lösungsmitteln und bei unterschiedlicher Viskosität liegt die Vermutung nahe, dass die konformationelle Relaxation (*conformational relaxation*) des Phenylrings einen wichtigen Beitrag zu den außergewöhnlichen photophysikalischen Eigenschaften von Ethidium und insbesondere auch von der 4-*N,N*-diethylaminophenylsubstituierten Verbindung **4** leistet. Daher scheint es plausibel, nach einem Mechanismus zu suchen, in dem die Rotation eines substituierten Phenylrings entscheidenden Einfluss auf die Lage und den Zerfall des angeregten Zustands hat.

Betrachtet man die Quantenausbeuten des Phenanthridinium-Derivats **4** im Vergleich zu Ethidium, so fällt auf, dass die Fluoreszenz von Verbindung **4** in wässriger Lösung deutlich stärker gelöscht wird als die von Ethidium. Da die zusätzliche elektronenschiebende *N,N*-Diethylamino-Funktion am Phenylring von Verbindung **4** den einzigen strukturellen Unterschied zwischen beiden Derivaten darstellt, liegt die Vermutung nahe, dass die stärkere Fluoreszenzlöschung durch intramolekulare Ladungstransferprozesse bedingt ist. Wendet man das Konzept der „verdrillten intramolekularen Ladungsübertragungszustände“ oder kurz TICT-Zustände (*Twisted Intramolecular Charge Transfer*, vgl. Kapitel 3.2.2) auf die untersuchten Phenanthridinium-Derivate an, kann die stärkere Fluoreszenzlöschung durch die Besetzung eines niederenergetischen Ladungstransferzustands (*charge transfer state*) in Verbindung **4** erklärt werden. Dieser TICT-Zustand kann nach Anregung durch eine spontane Verdrillung des 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituenten in die energetisch günstigere orthogonale Konformation entstehen, wodurch die Elektronen-Donor-Gruppe vom Akzeptor-System entkoppelt wird. Da der strahlende Übergang vom TICT-Zustand in den Grundzustand (Rückladungstransfer) zwei π -Orbitale betrifft, die im Mittel senkrecht aufeinander stehen, ist er überlappingsverboten, d. h. die Übergangswahrscheinlichkeit ist gering.^[73] Daher zerfällt der angeregte TICT-Zustand häufig schneller durch strahlungslose Desaktivierungsprozesse, was sich in einer deutlich verminderten Fluoreszenzquantenausbeute bemerkbar macht. Ebenso wie bei den in Kapitel 3.2.2 erwähnten Di- oder Triphenylmethan-Farbstoffen (z. B. Malachitgrün und Kristallviolett) erhöht sich auch die Fluoreszenzquantenausbeute von Verbindung **4** für den Fall, dass die Beweglichkeit der

Dialkylanilin-Gruppen eingeschränkt oder komplett verhindert wird, z. B. durch Erhöhung der Viskosität des Lösungsmittels. ^[70-72] Ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität von Verbindung **4** wurde auch bei Interkalation in DNA beobachtet (vgl. Kapitel 4.5.2). Geht man davon aus, dass ein TICT-ähnlicher Mechanismus zumindest teilweise für die Fluoreszenzlöschung von Verbindung **4** in wässriger Lösung verantwortlich ist, so kann der Fluoreszenzanstieg bei Interkalation in DNA dadurch erklärt werden, dass die strahlungslose Relaxation durch Interkalation teilweise oder komplett verhindert wird.

Um die Hypothese der TICT-Zustände für Verbindung **4** und Ethidium zu überprüfen, wurden quantenmechanische Berechnungen anhand der Modellverbindungen **E(M)**, **3(M)** und **23(M)** durchgeführt, deren Struktur sich von den untersuchten Phenanthridinium-Derivaten **E**, **3** und **4** durch einen Austausch des Ethyl-Substituenten gegen einen Methyl-Substituenten an Position 5 unterscheidet (vgl. Abb. 4-24). Verbindung **23(M)** enthält außerdem einen 4-*N,N*-Dimethylamino-Substituenten statt des 4-*N,N*-Diethylamino-Substituenten in Verbindung **4**. Zusätzlich wurden auch Rechnungen für die Modellverbindung **50(M)** durchgeführt, die, entsprechend des vorgeschlagenen Mechanismus, einen noch stärkeren Fluoreszenzanstieg in viskosen Medien und DNA aufweisen sollte. Im ersten Schritt wurden semiempirische *AM1/ZINDO*-Berechnungsmethoden verwendet um die Eigenschaften der vier Verbindungen untereinander vergleichen zu können. Im zweiten Schritt wurden Berechnungen mit Hilfe der *ab initio* DFT-Methode durchgeführt, um die Ergebnisse der ersten Berechnung für Verbindung **4(M)** zu verifizieren.

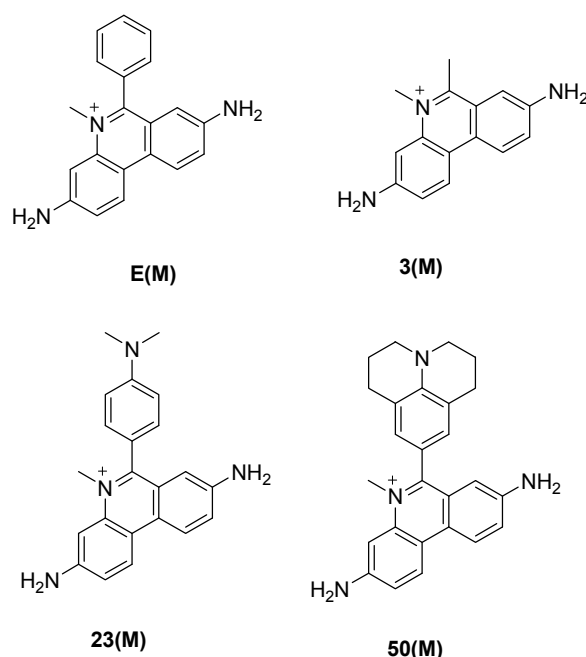


Abb. 4-24: Strukturen der Verbindungen für die quantenmechanische Rechnungen durchgeführt wurden.

Die Werte in Tabelle 4-7 zeigen, dass die an den optimierten Grundzustandsgeometrien mittels *AMI* durchgeführten Rechnungen eine gute Übereinstimmung der berechneten Übergangsenergien mit den experimentellen Daten liefert, wodurch die Lage des niedrigsten angeregten Zustands S_1 bestätigt wird. Die berechnete Oszillatorstärke steigt in der gleichen Reihenfolge wie der experimentell bestimmte Extinktionskoeffizient ($3(M) < E(M) < 23(M)$). Geht man von einer Verdrillung des Donorsubstituenten um 90° aus, so ergeben sich für die Ladungsverteilung zwei Möglichkeiten. Entweder wird ein Elektron des Donors komplett auf das positiv geladene Phenanthridinium-Grundgerüst übertragen, oder es findet kein Ladungstransfer statt und die positive Ladung am Phenanthridinium-Grundgerüst bleibt bestehen. In diesem Fall wird der zugehörige angeregte Zustand als „lokal angeregt“ (LE, *locally excited*) bezeichnet. Vergleicht man einen LE-Zustand mit einem CT-Zustand, stellt man fest, dass sich die positive Ladung an unterschiedlichen Stellen im Molekül befindet. Der Ladungstransferprozess, der von einem LE- in einen CT-Zustand führt, ist demnach mit einer Verschiebung der positiven Ladung in Richtung des Elektronen-Donors verbunden. Befindet sich der CT-Zustand in energetischer Reichweite von der S_1 -Potentialhyperfläche, kann er von dem zunächst im Gleichgewicht vorliegenden angeregten LE-Zustand, in dem die positive Ladung hauptsächlich am Phenanthridinium-Grundgerüst lokalisiert ist, besetzt werden, was zu einer Löschung der Fluoreszenz führt.

Tabelle 4-7: Ergebnisse der quantenmechanischen Berechnungen für $E(M)$, $3(M)$, $23(M)$ und den postulierten Farbstoff $50(M)$.

Vermessene Strukturen	E	3	4	-
Berechnete Strukturen	$E(M)$	$3(M)$	$23(M)$	$50(M)$
Fluoreszenz Anstieg (exp.) ^[a]	10	7	21	n.b. ^[b]
ΔE_{01} / eV (exp.)	2,6	2,7	2,6	n.b.
ΔE_{01} / eV (eq., ber.)	2,61	2,55	2,53	2,46
ϵ / $M^{-1}cm^{-1}$ (exp.)	5420	4640	8180	n.b.
Oszillatorstärke f (ber.)	0,29	0,24	0,42	0,41
Verdrillungswinkel/ ° (eq., ber.)	84	-	67	64
S_0 – Barriere zu 90° [cm^{-1}]	22	-	32	137
ΔE_{01} / eV (90° ; ber.)	2,59	-	2,65 ^[c]	2,52 ^[d]
ΔE_{CT-LE} / eV (90° ; ber.) ^[e]	0,95	-	0,01	0,12

^[a]Fluoreszenzanstieg aus Titrationsexperimenten mit DNA, siehe Kap. 4.5.2. ^[b]n.b.: nicht bestimmt. ^[c] S_1 (LE) und S_2 (CT) sind fast entartet. ^[d] S_1 (CT) und S_2 (LE). ^[e]Energieunterschied von S_1 (CT) zum nächsthöheren (LE) Zustand.

Die starke Ladungsverschiebung im CT-Zustand ist auch für die Verringerung der Energie in polaren Lösungsmitteln verantwortlich. Jede Verteilung von Ladungen in einem positiv

geladenen System, wie z. B. bei Verbindung **4**, kann mit Hilfe einer Multipol Expansion beschrieben werden,^[401] was im einfachsten Fall zu einem Monopol und einem Dipol führt. Aufgrund der dipolaren Komponente wird die Verbindung in polaren Lösungsmitteln zusätzlich energetisch stabilisiert. Daher kann man davon ausgehen, dass die hier für die Gasphase berechnete Energie des CT-Zustands aufgrund der Wechselwirkungen des Lösungsmittels mit der positiven Ladung der Verbindung in polaren Lösungsmitteln deutlich niedriger liegt. Die Lage des LE-Zustands wird durch diese Wechselwirkungen nicht so stark beeinflusst, da der zusätzliche Beitrag des Dipols nur den CT-Zustand betrifft. Das führt dazu, dass sich der CT-Zustand dem LE-Zustand energetisch annähert und somit vom LE-Zustand leichter erreichbar wird. Daraus ergibt sich, dass die Fluoreszenzlöschung bei steigender Lösungsmittelpolarität zunehmen sollte. *Ephardt et al.* zeigten dies für eine dem Phenanthridinium-Derivat **4** ähnliche Verbindung, bei der das Phenanthridinium-Grundgerüst gegen ein Pyridinium-Grundgerüst ersetzt war.^[402] Quantenmechanische Berechnungen zu diesem Molekül lieferten ähnliche Ergebnisse wie die von Verbindung **23(M)** (entspricht Verbindung **4**), d. h. dass in beiden Fällen ein CT-Zustand mit kompletter Ladungsverschiebung durch eine Verdrillung des Torsionswinkels um 90° erreicht werden kann.^[403]

Auch die Fluoreszenz von Verbindung **4** wird mit steigender Lösungsmittelpolarität immer stärker gelöscht (vgl. Kapitel 4.3.2) und nimmt mit steigender Viskosität des Lösungsmittels immer stärker zu (vgl. Kapitel 4.6). Die Ergebnisse der *DFT*-Rechnungen zu Verbindung **23(M)** (entspricht Verbindung **4**) bestätigen den Ladungstransfercharakter des angeregten Zustands in orthogonaler Konformation, bei dem die positive Ladung komplett auf der Donor-Gruppe lokalisiert ist, was im Einklang mit dem TICT-Konzept steht (vgl. Abb. 4-25 und 4-26). Ein solcher CT-Zustand führt zu a) einer starken Ladungsverschiebung, b) einer Verringerung des Übergangsmoments was eine geringe Oszillatorstärke sowie eine niedrige Ratenkonstante für strahlende Prozesse mit sich bringt, c) einer hohen Ratenkonstante für strahlungslose Prozesse, die eine starke Fluoreszenzlöschung bedingt, d) einem energetisch nahe gelegenen CT-Triplett-Zustand, der zusätzlich eine schnelle Depopulation des angeregten Singulett-Zustands verursachen kann. Die drei genannten Faktoren b)- d) verringern die Fluoreszenzquantenausbeute durch intrinsische photophysikalische Prozesse des verdrillten CT-Zustands, während Faktor a) zu einer energetischen Absenkung des CT-Zustands in polaren Lösungsmitteln und damit zu einer stärkeren Besetzung dieses Zustands führt. Folglich werden die Fluoreszenzeigenschaften entsprechender Verbindungen hauptsächlich durch die Polarität und die Viskosität des Lösungsmittels bestimmt, da die Möglichkeit einer verdrillten Relaxation von der Rigidität der Umgebung abhängt.

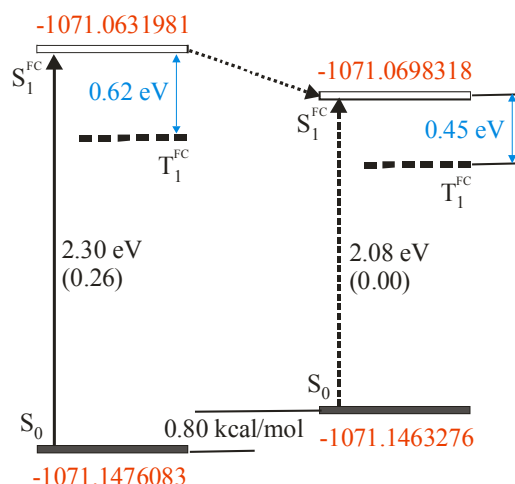


Abb. 4-25: Qualitatives Schema des Grundzustands (S_0) und der angeregten Zustände (S_1^{FC} und T_1^{FC}) von Verbindung **23(M)**. Die Energien wurden mittels *B3LYP* (Grundzustände) und *TDB3LYP* (angeregte Zustände) mit dem Basissatz *6-31+G(2df,2p)* für die optimierte Gleichgewichts- (links) sowie für die orthogonale Konformation (rechts) von Verbindung **23(M)** berechnet. Die rot markierten Werte zeigen die Energie in Hartree Einheiten, die eingeklammerten Werte entsprechen der Oszillatorstärke.

Abb. 4-25 zeigt, dass die Relaxation vom LE-Zustand in den CT-Zustand für Verbindung **4** energetisch begünstigt ist und dass der Abstand zwischen dem Grundzustand und dem niedrigsten Triplett-Zustand verringert ist, was eine erhöhte strahlungslose Desaktivierung des CT-Zustands verursacht. Darüber hinaus ergibt sich ein Triplett-Zustand mit „CT-Charakter“, der isoenergetisch zum CT-Singulett-Zustand bei einem Torsionswinkel von 90° gelegen ist, wie man es entsprechend dem TICT-Konzept erwarten würde. Im Gegensatz zum CT-Zustand verbleibt bei einem reinen LE-Zustand die positive Ladung am Phenanthridinium-Grundgerüst ($\pi\pi^*$ -Zustand). Geht man von einer Gleichgewichtsgeometrie (S_1^{FC} -Zustand) bei Verbindung **23(M)** (und dementsprechend Verbindung **4**) aus, wird ein kleiner Teil der Ladung aufgrund einer schwachen π -Wechselwirkung auf den Donorsubstituenten übertragen, im Wesentlichen handelt es sich allerdings um einen LE-Zustand. Das sieht man deutlich anhand der Darstellung der Grenzorbitale (Abb. 4-26, links), die in dieser Konformation nur wenig delokalisiert vorliegen. Bei einem Torsionswinkel von 90° sind die Orbitale, die an der Anregung beteiligt sind, jedoch ausschließlich am Phenanthridinium-Grundgerüst oder am Donorsubstituenten lokalisiert, was den absoluten CT-Charakter bestätigt, der für die Verringerung der Oszillatorstärke und die ausgeprägte Ladungsverschiebung verantwortlich ist (Abb. 4-26, rechts).

Vergleicht man die Ergebnisse der *DFT*-Berechnung mit denen der *AMI*- und *ZINDO*-Methoden (Tabelle 4-7), so fällt auf, dass die letztgenannten die Energie des CT-Zustands

deutlich stärker überschätzen als die des LE-Zustands. Trotzdem ist der energetische Abstand klein genug um eine thermische Population zu ermöglichen.

Aufgrund der besseren Donor-Eigenschaften des Julolidino-Substituenten, verglichen mit dem *N,N*-Dimethylanilino-Rest von Verbindung **23(M)**, wird für Verbindung **50(M)** eine zusätzliche Absenkung der Energie des CT-Zustands relativ zum LE-Zustand erwartet. Quantenmechanische Rechnungen bestätigen, dass der CT-Zustand den niedrigsten angeregten Zustand bei einem Torsionswinkel von 90° darstellt, mit einem Abstand von 0,12 eV zum nächsthöheren (LE-)Zustand. Daraus ergibt sich, dass die postulierte Verbindung **50(M)** einen noch stärkeren Fluoreszenzanstieg sowohl bei Interkalation in DNA als auch bei erhöhter Viskosität verglichen mit dem Farbstoff **4** aufweisen sollte.

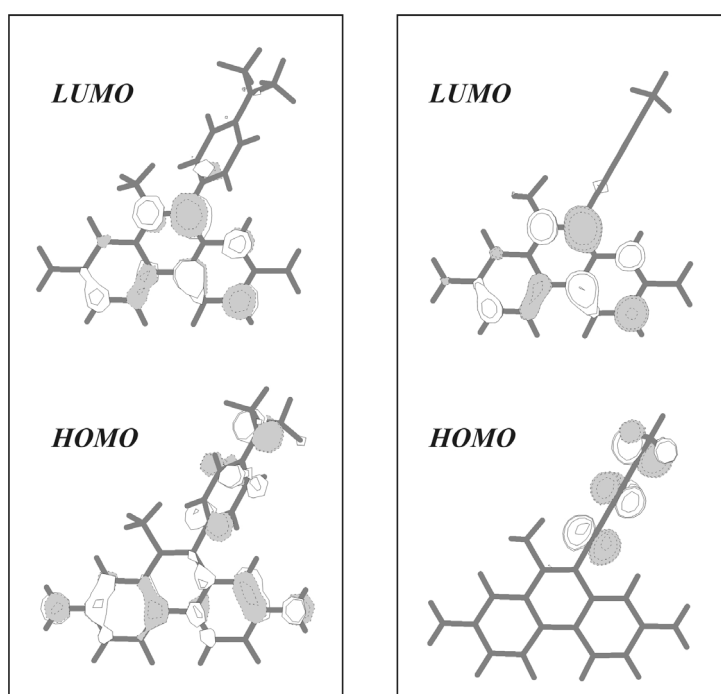


Abb. 4-26: Darstellung der HOMO- und LUMO-Orbitale, die die elektronische Konfiguration des angeregten S_1^{FC} -Zustands der kationischen Verbindung **4** im Wesentlichen ausmachen. Links: Orbitale bei optimierter Gleichgewichtsgeometrie (Torsionswinkel von $62,6^\circ$). Die Ladungsverschiebung ist aufgrund der stärkeren Delokalisierung verringert. Rechts: Orbitale in orthogonaler Konformation. Bei der HOMO-LUMO-Anregung (CT-Zustand) wird ein Elektron vom Donor-Rest in Richtung Phenanthridinium-Grundgerüst verschoben, während die positive Ladung in die entgegengesetzte Richtung wandert.

Für **E(M)**, mit der Phenylgruppe als schwachem Donor, zeigen die Berechnungen, dass der CT-Zustand relativ energiereich ist, was darauf hindeutet, dass der beschriebene Mechanismus bestenfalls eine untergeordnete Rolle spielt. Verglichen mit den Berechnungen in der Gasphase kann der energetische Abstand zwischen dem CT- und LE-Zustand in

Lösung, bedingt durch den Einfluss des polaren Lösungsmittels, leicht verändert sein. Der stärkere Anstieg der Fluoreszenzquantenausbeute von Ethidium bei steigender Viskosität (vgl. Kapitel 4.6) und bei Interkalation in DNA, verglichen mit Verbindung **3** sowie die transienten Fluoreszenzmessungen von *Sommer et al.*^[400] deuten nichtsdestotrotz darauf hin, dass die geringe Fluoreszenzquantenausbeute von Ethidumbromid in wässrigen Lösungen auch, wenn auch sicherlich nicht ausschließlich, durch eine Rotation des Phenylrings im angeregten Zustand verursacht wird.

4.8. Zusammenfassung

Die Phenanthridinium-Derivate **1-4**, die sich durch unterschiedliche Substituenten an den Positionen 3, 6 und 8 von Ethidium unterscheiden, wurden hergestellt und spektrophotometrisch, spektrofluorimetrisch und elektrochemisch untersucht, um neue Erkenntnisse bezüglich des Einflusses dieser Substituenten auf die photochemischen Eigenschaften von Ethidium zu gewinnen. Die Ergebnisse der UV/Vis-Messungen zeigten, dass die beiden exocyclischen Aminofunktionen entscheidend zum Absorptionsverhalten von Ethidium beitragen: Während die Verbindungen **3** und **4** ebenso wie Ethidium eine rotverschobene sog. *Charge-Transfer*-Bande aufweisen, liegt die langwelligste Absorptionsbande von **1** und **2** noch im UV-Bereich. Auch die Lage der Fluoreszenzmaxima wird durch die exocyclischen Aminofunktionen geprägt. Die beiden Didesaminoverbindungen **1** und **2** weisen nur sehr geringe Stokes-Shifts auf, während sich **3** und **4** auch hier „ethidiumähnlich“ verhalten. Die Quantenausbeuten von **1** und **2** sind in wässriger Pufferlösung deutlich höher als die von **E**, **3** und **4**. Insbesondere der zusätzliche elektronenschiebende Effekt des 4-*N,N*-Diethylamino-phenyl-Substituenten von Verbindung **4** führt zu einer ca. 100-fach stärkeren Löschung der Fluoreszenz verglichen mit **E**. Im Gegensatz zu **1** und **2**, deren Fluoreszenzquantenausbeute unabhängig vom pH-Wert der Lösung nahezu konstant blieb, konnte für **E**, **3** und **4** eine Löschung der Fluoreszenz bei steigendem pH-Wert beobachtet werden.

In organischen Lösungsmitteln wird die Fluoreszenz von **E** und **3** mit steigender Nukleophilie der Lösungsmittel, die durch die sog. Donornummer repräsentiert wird, gelöscht. Die Fluoreszenzlöschung von Verbindung **4** wird bei zunehmender Orientierungspolarisation Δf der Lösungsmittel verstärkt.

Auch die Redoxpotentiale der Phenanthridinium-Derivate im Grund- und im angeregten Zustand werden stark von den exocyclischen Aminofunktionen beeinflusst. Die beiden Didesaminoverbindungen **1** und **2** werden aufgrund des Fehlens der elektronenschiebenden

Aminogruppen im Grundzustand leichter reduziert als **E**, **3** und **4**. Im angeregten Zustand weisen die Farbstoffe **1** und **2** aufgrund der höheren Energie ihres HOMO-LUMO-Übergangs jedoch ein deutlich höheres Reduktionspotential auf als die Verbindungen **E**, **3** und **4**. Ethidium ist im angeregten Zustand geringfügig leichter zu reduzieren als **3** und **4**.

In spektrophotometrischen und spektrofluorimetrischen Titrationsexperimenten mit DNA wird das unterschiedliche Verhalten des Farbstoffpaares **1** und **2** verglichen mit **E** und dem Chromophorpaar **3** und **4** erneut deutlich. Die Absorption der Verbindungen **3** und **4** wird ebenso wie die von Ethidium bei Zugabe von DNA um ca. 40 nm in den längerwelligen Bereich verschoben, das Absorptionsmaximum von **1** und **2** verschiebt sich hingegen kaum. Bei Zugabe von DNA beobachtet man für **E**, **3** und **4** eine Blauverschiebung des Emissionsmaximums sowie einem starken Anstieg der Fluoreszenzintensität. Der relative Anstieg der Fluoreszenz korreliert dabei mit dem elektronenschiebenden Charakter des Substituenten in Position 6: Verbindung **3** weist lediglich eine ca. 7-fache Erhöhung auf, während die Fluoreszenz von Verbindung **4** auf das ca. 21-fache, und somit etwa doppelt so hoch im Vergleich zu Ethidium, ansteigt. Auch die Bindungskonstanten, die für **E**, **3** und **4** im Bereich von 10^5 M^{-1} liegen, nehmen mit steigendem Elektronendonator-Potential des Substituenten an Position 6 zu. Die Fluoreszenzmessungen der Didesaminoverbindungen **1** und **2** zeigen hingegen eine starke Löschung der Emission bei Zugabe von DNA, die wahrscheinlich auf einen photoinduzierten Ladungstransfer dieser Farbstoffe auf die DNA-Basen, v. a. auf die elektronenreichen Guanine, zurück zu führen ist. Die Bindungskonstanten von **1** und **2** liegen ca. eine Zehnerpotenz niedriger als die der Diaminoverbindungen.

Die Ergebnisse der Quantenausbeutebestimmung bei unterschiedlicher Viskosität des Mediums, was einerseits durch Variation der Temperatur von reinem Glycerin, andererseits durch Verwendung verschiedener Glycerin-Wasser-Mischungen erreicht wurde, zeigen, dass die Fluoreszenzquantenausbeuten der phenylsubstituierten Phenanthridinium-Derivate **2** und **E** im Vergleich zu den entsprechenden methylsubstituierten Verbindungen **1** und **3** bei steigender Viskosität stärker ansteigen. Die mit Abstand stärkste Viskositätsabhängigkeit wurde für die Emission von Verbindung **4** beobachtet. Außerdem wurde gezeigt, dass Verbindung **4** das Torsionsmodell von Förster und Hoffmann gut erfüllt, was für **E** und **2** nicht zutrifft. Zur Bestimmung der Arrhenius-Parameter der strahlungslosen Relaxation der Phenanthridinium-Derivate wurden die Fluoreszenzlebenszeiten der Verbindungen in Glycerin bei unterschiedlichen Temperaturen mit Hilfe der Strickler-Berg-Gleichung abgeschätzt. Die hohe Aktivierungsenergie von Verbindung **4** und die gute Übereinstimmung mit dem Torsionsmodell von Förster und Hoffmann deuten darauf hin, dass die Rotation des

4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituenten im angeregten Zustand eine wichtige Rolle bei der strahlungslosen Relaxation spielt. Obwohl Ethidium eine vergleichsweise geringe Aktivierungsenergie aufweist und dem Modell von *Förster* und *Hoffmann* nicht genügt, kann man aufgrund des stärkeren Fluoreszenzanstiegs von **E** im Vergleich zu **3** in viskosen Medien davon ausgehen, dass eine Rotation des Phenylrings an der strahlungslosen Relaxation von **E** im angeregten Zustand beteiligt ist. Dieser Prozess scheint allerdings nicht hauptausschlaggebend für die Löschung der Fluoreszenz in polaren Lösungsmitteln zu sein.

Quantenmechanische Berechnungen deuten darauf hin, dass die Fluoreszenzlöschung von Verbindung **4** in polaren Lösungsmitteln durch Ausbildung von TICT-ähnlichen Zuständen verursacht wird. Der CT-Zustand, bei dem die positive Ladung komplett auf der Donorgruppe lokalisiert ist, kann durch eine Verdrillung des 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituenten um 90° zum Phenanthridinium-Grundgerüst erreicht werden. Außerdem wurde gezeigt, dass die Relaxation vom LE-Zustand in den CT-Zustand bei Verbindung **4** energetisch begünstigt und der Abstand zwischen dem Grundzustand und dem niedrigsten Triplett-Zustand verringert ist, was eine erhöhte strahlungslose Desaktivierung des CT-Zustands verursacht. Die energetische Erreichbarkeit des CT-Zustands hängt von der Stärke des elektronenschiebenden Substituenten am Phenylring ab und ändert sich durch Bindung an DNA. Außerdem wird die Bildung eines CT-Zustands durch erhöhte Viskosität des Lösungsmittels verhindert, wodurch auch der starke Fluoreszenzanstieg von Verbindung **4** in Glycerin erklärt werden kann.

5. Ethidium als Elektronendonator für Ladungstransferprozesse in Oligonukleotiden

5.1. Untersuchungen eines DETEQ-Systems aus Ethidium und 5-Nitroindol

In diesem Kapitel werden Untersuchungen mit ethidiummodifizierten Oligonukleotiden vorgestellt. Formell handelt es sich dabei um einen Phenanthridinium-Chromophor (**Et**), der strukturell eng mit dem 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid (Ethidiumbromid, **E**; vgl. Kapitel 3.5 und 4.1) verwandt ist. Daher wird im gesamten Kapitel 5 dieser kovalent an DNA gebundene Phenanthridinium-Farbstoff (**Et**) als „Ethidium“ bezeichnet. Sollte Ethidiumbromid (**E**) gemeint sein, wird es in diesem Kapitel auch explizit so angegeben.

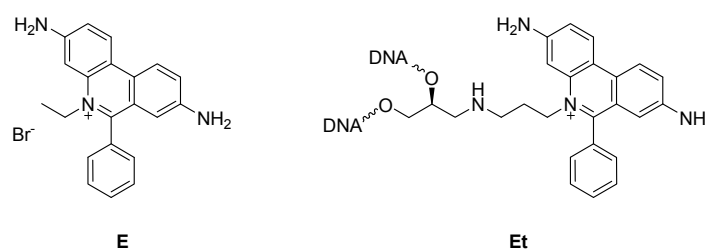


Abb. 5-1: Ethidiumbromid (**E**) und der als Ethidium bezeichnete Phenanthridinium-Chromophor (**Et**).

Aus zahlreichen Veröffentlichungen^[131, 136, 225, 226, 251, 404-408] ist bekannt, dass interkaliertes Ethidiumbromid (**E**) Ladungstransferprozesse in DNA induzieren kann. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe *Wagenknecht*^[28, 103, 409] wurde gezeigt, dass dies auch für das artifizielle Ethidiumnukleosid (**Et**) gilt. Mit einer Singulett-Energie von $E_{00}(\text{E}^{*+}) \approx 2,2 \text{ eV}$ ^[361] ergibt sich ein Potential von $E_{\text{red}}^*(\text{E}^{*+}/\text{Et}^{\bullet}) \approx 1,2 \text{ V}$ ^[361] für photoangeregtes Ethidium (Berechnung vgl. Kapitel 3.3.1). Die Oxidation von Guanin, das ein Potential von $E_{\text{ox}}(\text{G}^{++}/\text{G}) \approx 1,3 \text{ V}$ ^[156, 361] besitzt, kann trotz des niedrigeren Potentials von Ethidium im angeregten Zustand nicht ausgeschlossen werden, wenn man bedenkt, dass Wechselwirkungen mit den DNA-Basen zu Schwankungen von $\pm 100 \text{ mV}$ führen können.^[395] Untersuchungen von *Huber et al.*^[102] zeigen eine schwache Löschung der Fluoreszenz von Ethidium in guanin- und cytosinreicher Umgebung, die in einer Adenin- und Thymin-Umgebung nicht beobachtet werden konnte. Dies deutet auf die Bildung eines partiellen CT-Komplexes v. a. mit den elektronenreichen Guaninen hin. Cytosin und Thymin, die mit $E_{\text{red}}(\text{C}/\text{C}^{\bullet-}) \approx E_{\text{red}}(\text{T}/\text{T}^{\bullet-}) \approx -1,8 \text{ V}$ ^[30, 197] die niedrigsten Redoxpotentiale der natürlichen DNA-Basen aufweisen, können allerdings sicherlich nicht durch photoangeregtes Ethidium mit

einem Potential von $E_{\text{ox}}^*(\text{Et}^{2+}/\text{Et}^{*+}) \approx -0,5 \text{ V}^{[408]}$ reduziert werden. Reduktiver Elektronentransfer kann demzufolge nur dann von Ethidium ausgehen, wenn geeignete Akzeptoren zur Verfügung gestellt werden.^[28, 156, 185, 225, 361, 407-409] Ethidium wurde bereits in Kombination mit 7-Deazaguanin (**Zg**; $E_{\text{ox}}(\text{Zg}^{+}/\text{Zg}) \approx 1,0 \text{ V}^{[156]}$ als Lochakzeptor ebenso wie mit 5-Nitroindol (**Ni**; $E_{\text{red}}(\text{Ni}/\text{Ni}^{*}) \approx -0,32 \text{ V}^{[410]}$ als Elektronenakzeptor eingesetzt. Sowohl für den oxidativen Lochtransfer zwischen **Et** und **Zg**, als auch für den reduktiven Elektronentransfer zwischen **Et** und **Ni** ergibt sich nach *Rehm-Weller* eine Triebkraft von $\Delta G \approx -0,2 \text{ eV}$. Beide Arten des Ladungstransfers konnten durch Löschung der Fluoreszenz von Ethidium beobachtet und mittels zeitaufgelöster Messungen charakterisiert werden.^[27, 28, 30, 131, 225, 226, 251, 404-409] Ein Beispiel dazu wurde bereits in den Kapiteln 3.5 erläutert.

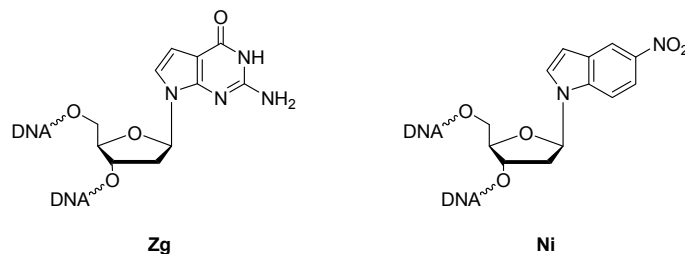


Abb. 5-2: Der Lochakzeptor 7-Deazaguanin (**Zg**) und der Elektronenakzeptor 5-Nitroindol (**Ni**).

Im Folgenden soll der reduktive Elektronentransfer zwischen Ethidium (**Et**) als Donor und 5-Nitroindol (**Ni**) als Akzeptor genauer untersucht werden. Dazu wurden das Ethidium-Nukleosid (**Et**) und das kommerziell erhältliche Nitroindolbasensurrogat (**Ni**) an definierten Positionen in die DNA eingebaut. Zur Untersuchung der Distanzabhängigkeit der Ladungstransferprozesse ist es zwingend erforderlich, dass der Ethidium-Chromophor an einer bestimmten Position in den Basenstapel interkaliert und sich somit in einem genau definierten Abstand zum Ladungsakzeptor befindet.

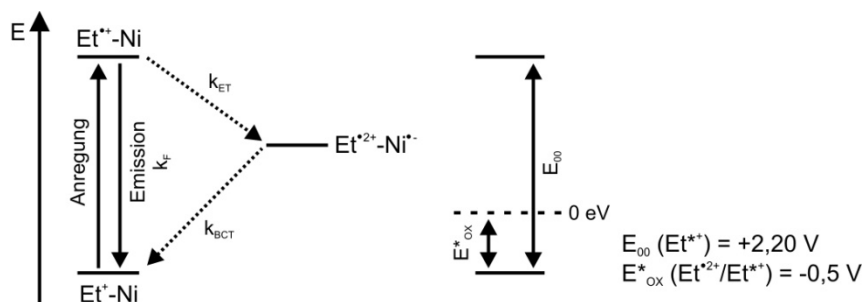


Abb. 5-3: Photoangeregtes Ethidium als Reduktionsmittel im System Ethidium-Nitroindol. Erläuterungen: k_{ET} : Rate des reduktiven Elektronentransfers, k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

5.1.1. Ethidium als artifizielle DNA-Base

Die Synthese des Ethidiumbausteins (**38**) erfolgte ausgehend von kommerziell erhältlichem 3,8-Diamino-6-phenyl-phenanthridin (**32**) und wurde entsprechend der Literatur durchgeführt.^[102, 103] Abb. 5-4 zeigt die einzelnen Synthesestufen, die hier lediglich kurz zusammengefasst werden.

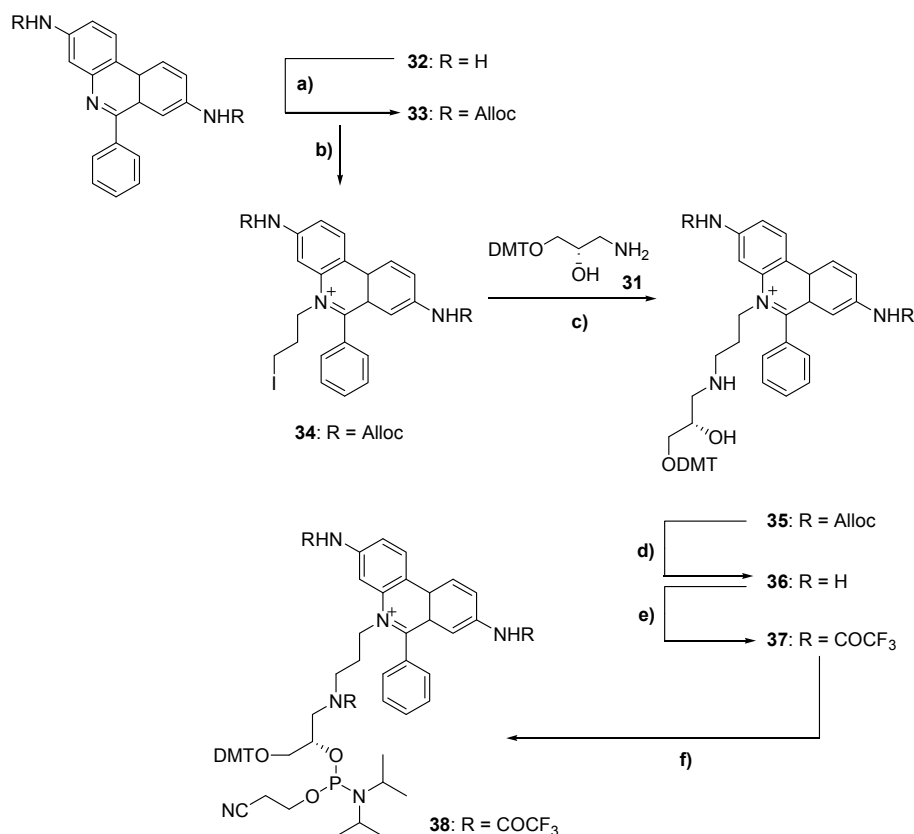


Abb. 5-4: Syntheschema zur Darstellung des ethidiummodifizierten DNA-Bausteins **38**.^[102, 103] a) Chlorameisensäureallylester (17 eq.), CH₂Cl₂, 48 h, RT (94 %); b) Diiodpropan (10 eq.), THF, 9 d, 70 °C (95 %); c) **31** (1,5 eq.), DIPEA (2 eq.), DMF, 40 h, RT (88 %); d) Bu₃SnH (3 eq.), Pd(PPh₃)₄ (2 mol-%), PPh₃ (20 mol-%), CH₂Cl₂/H₂O 300/1, 90 min., RT (64 %); e) (CF₃CO)₂O (6 eq.), Pyridin (12 eq.), CH₂Cl₂, 10 min., 0 °C, 10 min., RT, (79 %); f) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (2 eq.), DIPEA (4 eq.), CH₂Cl₂, 45 min., RT (95 %).

Im ersten Schritt werden die beiden exozyklischen Aminfunktionen von **32** mit Chlorameisensäureallylester geschützt. Anschließend wird der Stickstoff an Position 5 im Phenanthridin-Grundgerüst durch eine Reaktion mit 1,3-Diiodpropan alkyliert. Durch Umsetzung des Iodids **34** mit dem Aminopropandiol-Linker **31** erhält man das Ethidium-Nukleosid **35**. In den nächsten beiden Stufen werden die Alloc-Schutzgruppen von **35** durch Trifluoracetylgruppen ersetzt. Die Entfernung der Alloc-Schutzgruppen zu diesem Zeitpunkt

ist zwingend erforderlich, da bei der Pd-katalysierten Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen nach der DNA-Festphasensynthese eine Allylübertragung auf einen der exocyclischen Amin-Substituenten des Ethidiumchromophors beobachtet wurde, die auch durch Überschuss verschiedener Allylakteptoren nicht verhindert werden konnte.^[409] Die Abspaltung der Alloc-Schutzgruppen lässt sich optisch gut verfolgen, da bei der Freisetzung der exozyklischen Amin-Funktionen ein Farbumschlag von gelb nach pink erfolgt. Bei der darauffolgenden Einführung der Trifluoracetylgruppen wird zusätzlich auch die sekundäre Aminofunktion des Linkers in **37** geschützt. Im Anschluss daran kann die Phosphoramidit-Synthese von **37** nach **38** durchgeführt werden.

Das Phosphoramidit **38** wurde in MeCN gelöst und in den DNA-Synthesizer eingebracht. Eine gute Kupplungseffizienz wird durch Erhöhung der Konzentration auf 1,7 M und unter Verwendung eines modifizierten Protokolls mit einer verlängerten Kupplungsdauer von 1 h innerhalb von zwei Zyklen erreicht.^[102, 409]

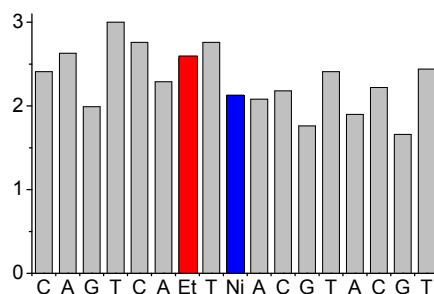


Abb. 5-5: Beispielhafte Darstellung des Tritylmonitors der Synthese von ethidium- und nitroindolmodifizierter ssDNA2.

Abspaltung und Aufarbeitung der ethidiummodifizierten Oligonukleotide erfolgten nach Vorschriften aus der Literatur.^[102, 409] Die Reinigung wurde mittels RP-HPLC durchgeführt (genaue Bedingungen siehe Kapitel 7.4.3), die Charakterisierung der gereinigten DNA-Stränge erfolgte durch ESI-MS.

5.1.2. Studien zum reduktiven Ladungstransfer mit Ethidium als Elektronendonator und 5-Nitroindol als Akzeptor

Durch frühere Arbeiten in unserer Arbeitsgruppe^[28, 30] konnte gezeigt werden, dass sowohl reduktiver Ladungstransfer zwischen Ethidium (**Et**) und 5-Nitroindol (**Ni**), als auch oxidativer Ladungstransfer zwischen Ethidium (**Et**) und 7-Deazaguanin (**Zg**) über eine Distanz von zwei

Basenpaaren möglich ist. Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass beide Mechanismen sehr ähnliche Abstandsabhängigkeiten und Ladungstransferraten k_{CT} aufweisen.^[28, 30] In den genannten Experimenten wurde ein sog. *dSpacer* (**S**), das chemisch stabile Analogon einer abasischen Stelle, als Gegenbase zu Ethidium verwendet, um eine optimale Interkalation des sterisch gehinderten Ethidiumchromophors zu gewährleisten.^[103]

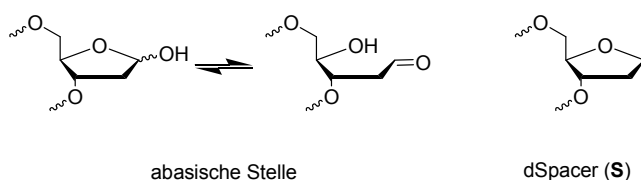


Abb. 5-6: dSpacer (**S**) als Analogon einer abasischen Stelle.

Wie bereits in Kapitel 3.7 erwähnt, wurde ein DETEQ-System (*Detection by Electron Transfer-controlled Emission Quenching*) basierend auf oxidativem Ladungstransfer zwischen kovalent gebundenem Ethidium und 7-Deazaguanin entwickelt und zur erfolgreichen Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen eingesetzt.^[27] In diesem Assay wurde C als Gegenbase von Ethidium gewählt. In früheren Arbeiten wurde herausgefunden, dass die Gegenbase nur geringfügig Einfluss auf das Interkalationsverhalten von Ethidium hat, mit C als Gegenbase wurde allerdings die höchste Fluoreszenzintensität detektiert.^[102] 7-Deazaguanin (**Zg**) paart bevorzugt mit C, was die praktische Anwendung des Assays einschränkt, da sich in der Sequenz der Ziel-DNA an entsprechender Stelle ein C befinden muss.

Zur Optimierung des Assays benötigt man daher als Ladungsakzeptor eine universelle Base, die keinerlei Präferenzen bezüglich der Gegenbase zeigt. 5-Nitroindol (**Ni**) stellt einen universellen Akzeptor für reduktiven Elektronentransfer dar.^[105, 106] Wie schon erwähnt, konnte photoinduzierter reduktiver Elektronentransfer zwischen Ethidium und 5-Nitroindol mittels Fluoreszenzlöschung und zeitaufgelöster Messungen belegt werden. Diese Messungen beschränken sich allerdings auf Duplexe, die einen *dSpacer* als Gegenbase zu Ethidium tragen und daher eine optimale Interkalation gewährleisten. Um eine universelle bioanalytische Anwendung sicher zu stellen, muss die abasische Stelle im Gegenstrang gegen eine natürliche Base ausgetauscht werden. In Analogie zum DETEQ-System aus Ethidium und 7-Deazaguanin wurde C als Gegenbase zu Ethidium und 5-Nitroindol gewählt.

Um festzustellen, ob die Anwesenheit einer natürlichen Base gegenüber Ethidium einen Einfluss auf die Ladungstransfereigenschaften in Ethidium-Nitroindol-Duplexen hat, wurden die ethidiummodifizierten Oligonukleotide **ssDNA2**, **ssDNA4**, **ssDNA6** und **ssDNA8** synthetisiert, bei denen Donor (Ethidium) und Akzeptor (5-Nitroindol) im Abstand von

einem, zwei und drei Basenpaaren kovalent in die Oligonukleotidsequenz eingebaut wurden. Als Referenzduplexe dienen **ssDNA3**, **ssDNA5**, **ssDNA7** und **ssDNA9**, bei denen 5-Nitroindol durch G ausgetauscht wurde und somit kein Ladungstransfer zu beobachten sein sollte.



Die Absorptionsmaxima der ethidiummodifizierten Oligonukleotide liegen im Bereich zwischen $\lambda = 525$ nm und 530 nm, Werte die charakteristisch für interkaliertes Ethidium sind.^[25, 256, 394, 411] Dabei unterscheiden sich die Maxima der ethidiummarkierten Einzelstränge nur unwesentlich von denen der entsprechenden Doppelstränge. Übereinstimmende Ergebnisse erhielten *Valis*^[28] für Einzelstränge und Duplexe mit abasischer Stelle gegenüber von Ethidium und *Cosa et al.*^[394] für Messungen mit nicht kovalent gebundenem Ethidium. Aus diesen Messreihen kann geschlossen werden, dass Ethidium bereits im Einzelstrang mit den Nachbarbasen wechselwirkt, was einen Shift des Absorptionsmaximums von $\lambda = 479$ nm für „freies“ Ethidium nach $\lambda = 525$ nm für interkaliertes Ethidium verursacht.^[394] Die Absorptionsspektren zeigen keinen nennenswerten Unterschied zwischen den Duplexen mit 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor (**DNA2**, **DNA4**, **DNA6** und **DNA8**) und denen ohne Akzeptor (**DNA3**, **DNA5**, **DNA7** und **DNA9**). Abb. 5-7 zeigt stellvertretend für die einzelnen ethidiummodifizierten Oligonukleotide die Absorptionsspektren von **DNA6** und **DNA7**.

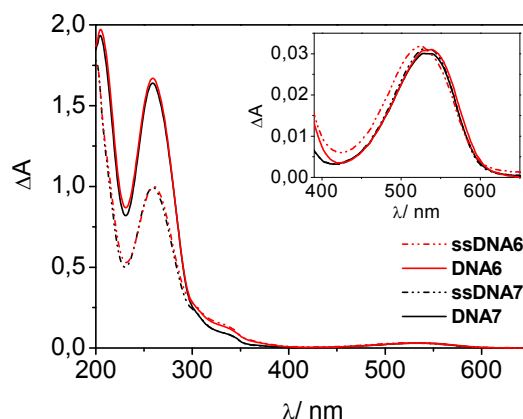


Abb. 5-7: UV/Vis-Absorptionsspektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor (**DNA6**, **DNA7**); 5 μ M Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Um den Ladungstransfer zwischen Ethidium und 5-Nitroindol zu untersuchen, wurde die Fluoreszenz der Duplexe **DNA2-DNA9** gemessen. Bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda = 530$ nm zeigen alle ethidiummodifizierten Einzel- und Doppelstränge Emissionsmaxima im Bereich zwischen $\lambda = 611$ nm und 622 nm. Abb. 5-8 zeigt die Emissionsspektren der Einzelstränge und Duplexe in Gegenwart und Abwesenheit von 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor. Die Spektren von **DNA4** und **DNA5** weisen keine nennenswerten Unterschiede zu **DNA6** und **DNA7** und wurden daher nicht abgebildet.

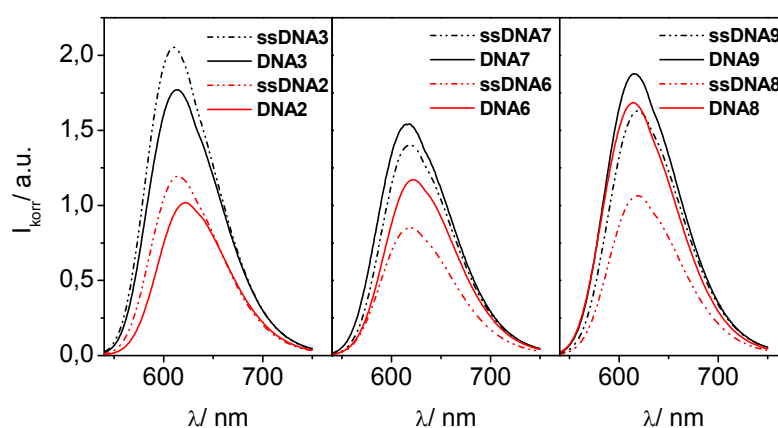


Abb. 5-8: Fluoreszenzspektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor (**DNA2-DNA3** und **DNA6-DNA9**), $\lambda_{\text{Ex}} = 530$ nm; 5 μ M Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Aus den Emissionsspektren erkennt man deutlich, dass die Fluoreszenzintensität der Kontrollduplexe **DNA3**, **DNA5**, **DNA7** und **DNA9** im Rahmen der Messgenauigkeit annähernd gleich ist. Die ethidiummodifizierten Duplexe, die zusätzlich noch 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor enthalten, zeigen hingegen eine Fluoreszenzlöschung, die mit zunehmendem Abstand zwischen Donor und Akzeptor abnimmt (**DNA2**→**DNA8**). Mittels zeitaufgelöster Messungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass diese Löschung durch Ladungstransfer von Ethidium auf 5-Nitroindol verursacht wird.^[30] Als Maß für die Fluoreszenzlöschung, die auf Ladungstransferprozessen beruht, verwendet man den F_q -Wert, der sich aus der integrierten Fluoreszenz des fehlgepaarten Duplexes (F_{int}) und der des korrekt gepaarten Duplexes (F_{int}^0) berechnen lässt:

$$F_q = 1 - \frac{F_{\text{int}}}{F_{\text{int}}^0} \quad \text{Gleichung 5-1}$$

Über eine Distanz von drei Basenpaaren sinkt die Löschung der Fluoreszenz für den reduktiven Ladungstransfer auf unter 10 % ab. Da *Valis et al.* sehr ähnliche Werte fanden, kann man davon ausgehen, dass der Ladungstransfer zwischen Ethidium und 5-Nitroindol von der Gegenbase des Ethidiums nicht nennenswert beeinflusst wird.

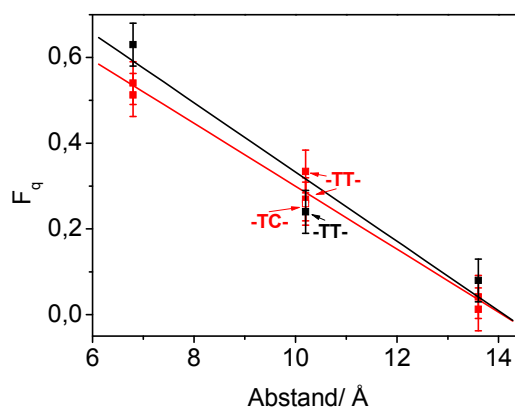


Abb. 5-9: Vergleich der Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Ethidium und 5-Nitroindol. Rot: Fluoreszenzmessungen der Duplexe **DNA2-DNA9**, $\lambda_{\text{Ex}} = 530$ nm; 5 μM Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. Schwarz: Ergebnisse von *Valis et al.*^[30]

Zu diesem Schluss kommt man auch, wenn man die Fluoreszenzlebenszeiten τ der beiden Systeme miteinander vergleicht. Dazu wurden die Fluoreszenzlebenszeiten τ der Kontrollduplexe **DNA3**, **DNA7** und **DNA9** und die der Ladungstransferduplexe **DNA2**, **DNA6** und **DNA8** mittels Phasenmodulation gemessen. Nach Anregung der Proben durch einen Laser bei $\lambda_{\text{Ex}} = 488$ nm, wird die Emission bezüglich des Anregungssignals verzögert, was dazu führt,

dass die Lebenszeit mit Hilfe der Phasenverschiebung ermittelt werden kann. Abb. 5-10 zeigt die Messdaten zur Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeit exemplarisch anhand von **DNA2** und **DNA3**.

Die Messung ergab ein biexponentielles Zerfallsverhalten des angeregten Ethidiums (**Et***). Es wurden pro Doppelstrang jeweils eine kurzlebige und eine langlebige Komponente ermittelt. Die Lebenszeiten τ des angeregten Ethidiums (**Et***) in **DNA2-DNA3** und **DNA6-DNA9** sowie deren Verteilung A sind in Tabelle 5-1 zusammengefasst.

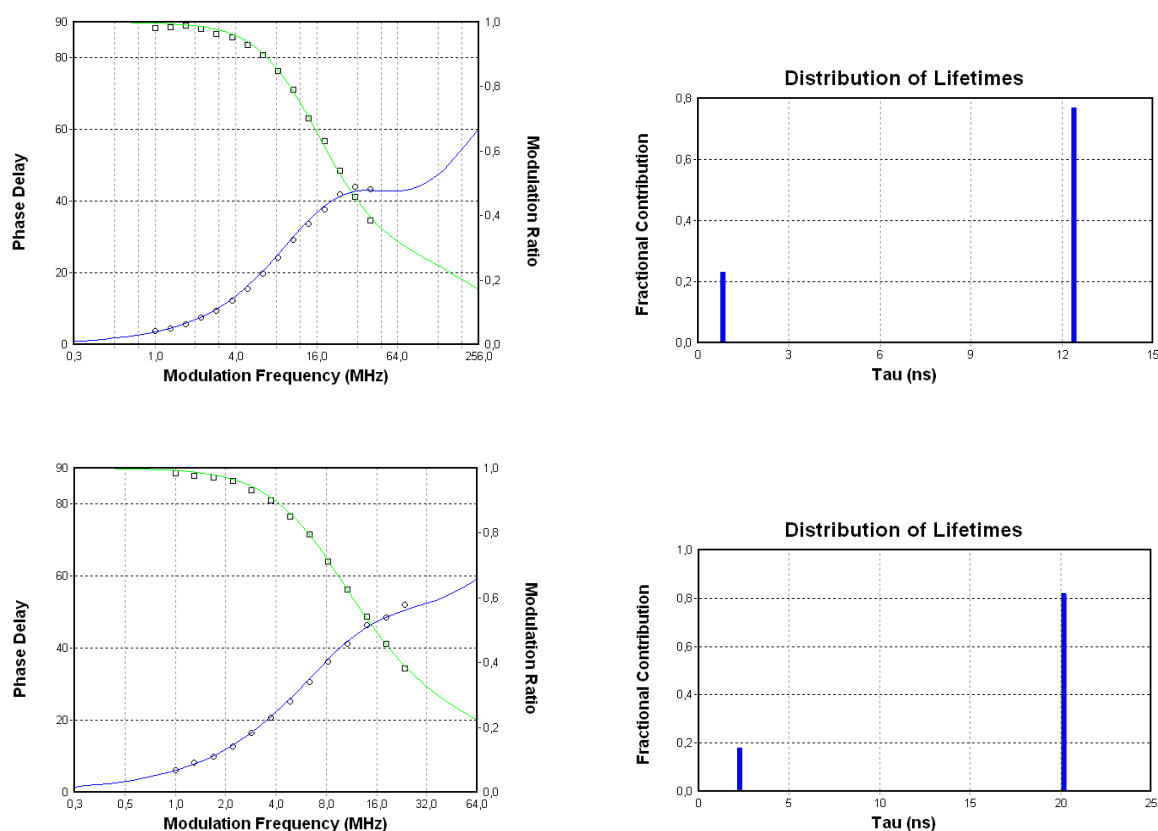


Abb. 5-10: Bestimmung der Fluoreszenzlebenszeiten von **DNA2** (oben) und **DNA3** (unten) mittels Phasenmodulation, $\lambda_{\text{Ex}} = 488 \text{ nm}$; $5 \mu\text{M}$ Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl , 20°C .

Laut *Olmsted et al.* ergeben sich für gebundenes Ethidium Lebenszeiten von $\tau_1 = 5,7 \text{ ns}$ (41 %) und $\tau_2 = 24,5 \text{ ns}$ (59 %).^[256] Daraus ergibt sich eine mittlere Lebenszeit von $\tau_F = 16,8 \text{ ns}$. In dieser Größenordnung liegen auch die erhaltenen Lebenszeiten für die Kontrollduplexe **DNA3**, **DNA7** und **DNA9**. Ist 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor vorhanden (**DNA2**, **DNA6** und **DNA8**), so erhält man niedrigere Werte für τ_F . Diese kürzeren Lebenszeiten des photoangeregten Ethidiums (**Et***) belegen Ladungstransferprozesse innerhalb der Duplexe. Betrachtet man die Werte genauer, so kann man auch hier eine Distanzabhängigkeit

feststellen. Während die durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit beim Ladungstransfer über eine Base von 16,9 ns auf 9,81 ns verkürzt wird, sinkt die Lebenszeit beim Ladungstransfer über drei Basen um lediglich 0,8 ns. Dies spiegelt die beobachtete geringe Fluoreszenzlöschung im Duplex **DNA8** wieder.

Tabelle. 5-1: Ermittelte Fluoreszenzlebenszeiten τ_F von Ethidium in Einzelsträngen und in Duplexen ohne Ladungsakzeptor (**DNA3**, **DNA7** und **DNA9**) und in Duplexen mit Ladungsakzeptor (**DNA2**, **DNA6** und **DNA8**). Vergleich der durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeiten mit Werten von *Valis et al.*^[30].

DNA-Duplex	τ_1 [ns]	Verteilung A_1	τ_2 [ns]	Verteilung A_2	τ_F [ns] ^[a]	τ_F [ns] ^[a,b]
ssDNA2	$0,804 \pm 0,01$	0,296	$13,9 \pm 0,02$	0,704	10,0	-
DNA2	$0,818 \pm 0,01$	0,226	$12,4 \pm 0,01$	0,774	9,81	(9,45) ^[c]
ssDNA3	$1,23 \pm 0,09$	0,166	$20,9 \pm 0,07$	0,834	17,6	-
DNA3	$2,27 \pm 0,05$	0,184	$20,2 \pm 0,05$	0,816	16,9	16,5
ssDNA6	$1,93 \pm 0,02$	0,299	$11,6 \pm 0,02$	0,701	8,74	-
DNA6	$1,21 \pm 0,02$	0,204	$13,6 \pm 0,02$	0,796	11,1	12,8
ssDNA7	$0,698 \pm 0,01$	0,127	$12,4 \pm 0,01$	0,873	10,9	-
DNA7	$0,707 \pm 0,02$	0,250	$17,4 \pm 0,05$	0,750	13,3	15,5
ssDNA8	$1,76 \pm 0,02$	0,297	$12,4 \pm 0,02$	0,703	9,25	-
DNA8	$1,07 \pm 0,02$	0,148	$18,2 \pm 0,03$	0,852	15,7	15,7
ssDNA9	$0,643 \pm 0,01$	0,170	$11,7 \pm 0,02$	0,830	9,86	-
DNA9	$0,790 \pm 0,02$	0,131	$18,9 \pm 0,05$	0,869	16,5	16,7

^[a]Durchschnittlich Fluoreszenzlebenszeiten berechnet nach $\tau = \tau_1 \cdot A_1 + \tau_2 \cdot A_2$. ^[b]Durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeiten des Systems von *Valis et al.* ^[c]Bestimmt durch femtosekundenaufgelöste Laserspektroskopie (sehr schnelle Zeitkomponente) in Kombination mit der Phasenmodulationsmethode (langsamere Zeitkomponente); Ladungstransfer über eine Base erfolgt im Bereich von 50 ps.

Die erhaltenen durchschnittlichen Lebenszeiten stimmen mit den Werten von *Valis et al.* gut überein, deren System sich lediglich durch eine abasische Stelle gegenüber des Ethidiums von den hier untersuchten Doppelsträngen unterscheidet.^[30] *Valis et al.* verwendeten ebenfalls die Phasenmodulationsmethode zur Bestimmung der Lebenszeiten, untersuchten vorher allerdings die Stränge zusätzlich mittels femtosekundenaufgelöster Laserspektroskopie. Dadurch konnten sie für den Ladungstransfer über einen Abstand von einer Base eine Zeitkomponente von 50 ps abschätzen, während über größere Distanzen und für die Kontrollduplexe nur Werte im ns-Bereich ermittelt werden konnten.^[30] Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass es auch für den Ladungstransfer von **DNA2** eine Zeitkomponente im ps-Bereich geben müsste, die mit der verwendeten Methode allerdings nicht bestimmt werden kann. Die Rate für den Ladungstransfer lässt sich aus der ermittelten Lebenszeit des Ladungstransferduplexes τ_F und der des Kontrollduplexes τ_{F0} ermitteln:

$$k_{CT} = \frac{1}{\tau_F} - \frac{1}{\tau_{F0}}$$

Gleichung 5-2

Aufgrund des multiexponentiellen Zerfallverhaltens ist nur eine Bestimmung der Größenordnung des Ladungstrfers möglich. Die ermittelten k_{CT} -Werte sind in Tabelle 5-2 wiedergegeben.

Tabelle. 5-2: Berechnete Raten k_{CT} für den Ladungstranfer zwischen Ethidium und 5-Nitroindol über eine Distanz von ein bis drei Basenpaaren. Vergleich mit Werten von *Valis et al.*^[30].

DNA-Duplex	k_{CT}/s^{-1}	k_{CT}/s^{-1} [30]
DNA2	$1,99 \cdot 10^{10}$ [a]	$1,99 \cdot 10^{10}$ [b]
DNA6	$1,49 \cdot 10^7$	$1,36 \cdot 10^7$
DNA8	$3,09 \cdot 10^6$	$3,81 \cdot 10^6$

[a]Berechnet unter der Annahme, dass auch hier, wie bei *Valis et al.*,^[30] eine Lebenszeit von 50 ps für den Ladungstransfer über ein Basenpaar von Ethidium auf 5-Nitroindol vorliegt. Diese konnte durch die verwendete Phasenmodulationsmethode nicht gemessen werden kann.

[b]Bestimmt aus der für den Ladungstransfer verantwortlichen Lebenszeit im ps-Bereich.

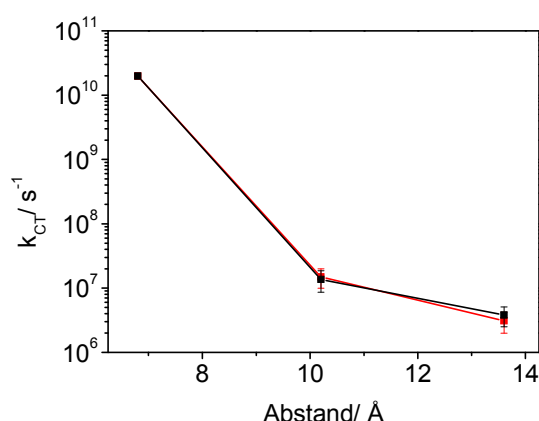


Abb. 5-11: Ladungstransferraten k_{CT} zwischen Ethidium und 5-Nitroindol in den Duplexen **DNA6** und **DNA8** (rot), berechnet aus den durchschnittlichen Fluoreszenzlebenszeiten, λ_{Ex} = 488 nm; 5 μ M Duplex in 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C. Im Vergleich dazu die von *Valis et al.* ermittelten Raten^[30] (schwarz).

Die Auftragung der Ladungstransferraten gegen den Abstand zwischen Ethidium und 5-Nitroindol unterstreicht nochmals die starke Distanzabhängigkeit des reduktiven Ladungstrfers. Sie zeigt aber zugleich auch, dass Anwesenheit einer natürlichen Base gegenüber von Ethidium keine Auswirkungen auf diese Raten hat. Auch die Ergebnisse der Fluoreszenzlebenszeitenmessung deuten darauf hin, dass die Effizienz des Ladungstrfers von der Gegenbase des Ethidiums nicht beeinflusst wird.

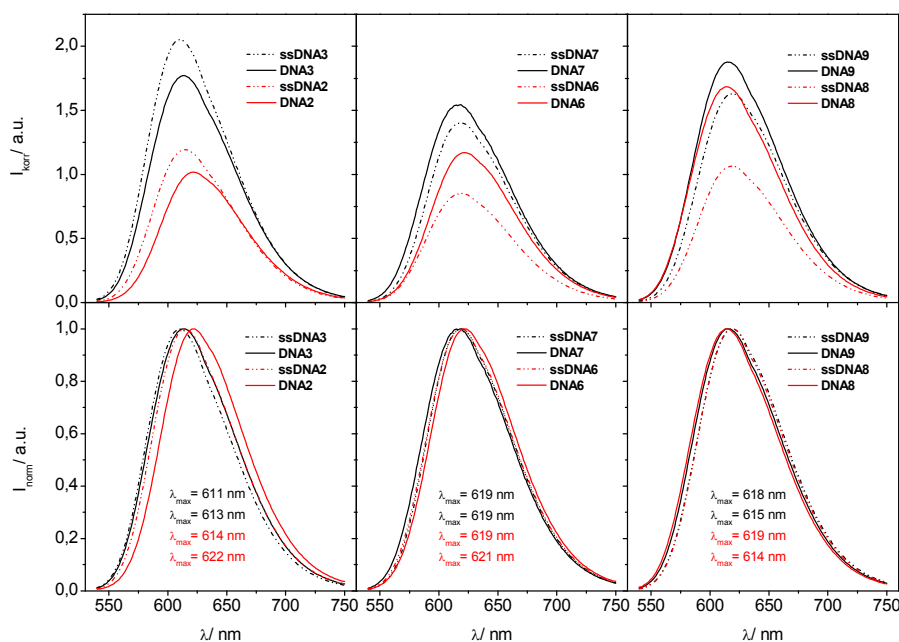


Abb. 5-12: Fluoreszenzspektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor (**DNA2-DNA3** und **DNA6-DNA9**), $\lambda_{\text{EX}} = 530 \text{ nm}$; $5 \mu\text{M}$ Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl , 20°C (oben). Normierte Fluoreszenzspektren (unten).

Betrachtet man die Fluoreszenzintensitäten der Einzelstränge (Abb. 5-12, oben), so erkennt man, dass die Intensität der ethidiummodifizierten Einzelstränge mit 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor (**ssDNA2**, **ssDNA4**, **ssDNA6** und **ssDNA8**) in allen Fällen niedriger ist, als die derer ohne 5-Nitroindol (**ssDNA3**, **ssDNA5**, **ssDNA7** und **ssDNA9**). Daraus lässt sich schließen, dass reduktiver Ladungstransfer auch im Einzelstrang stattfindet. *Menacher et al.*^[202] konnten reduktiven Elektronentransfer im Einzelstrang nachweisen. Sie untersuchten DNA-Stränge, die kovalent mit 5-Nitroindol und einem Thiazol-Orange-Derivat bzw. Cy3 modifiziert waren. In beiden Fällen war die Fluoreszenz im modifizierten Einzelstrang gelöscht, während sie bei der Hybridisierung mit einem komplementären Strang stark anstieg. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass der Ladungstransfer, der im Einzelstrang sehr effektiv ist, durch Hybridisierung zum Doppelstrang unterbrochen wird, was den starken Anstieg der Fluoreszenz erklärt (vgl. Abb. 5-13).

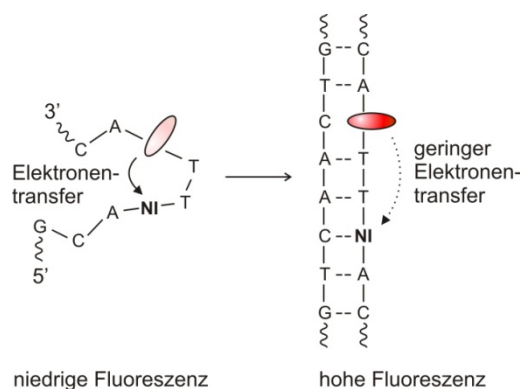


Abb. 5-13: Schematische Darstellung des reduktiven Elektronentransfers im Einzel- und Doppelstrang des Systems Ethidium-Nitroindol.

Vergleicht man die Fluoreszenzintensitäten der Einzel- und Doppelstränge miteinander (Abb. 5-12, oben), so ergibt sich ein uneinheitliches Bild: Während die Intensitäten der Einzelstränge **ssDNA2** und **ssDNA3** höher liegen als die der zugehörigen Duplexe **DNA2** und **DNA3**, verhält es sich für die restlichen Stränge genau umgekehrt. Bekanntermaßen deutet sowohl ein starker Anstieg der Fluoreszenz, als auch eine Verschiebung des Emissionsmaximums zu kürzeren Wellenlängen auf die Interkalation von Ethidium in DNA hin. Betrachtet man die normierten Emissionsspektren der untersuchten Stränge genauer (vgl. Abb. 5-12, unten), so erkennt man eine deutliche Variation der Maxima, die bei den Ladungstransfersträngen mit einer Base bzw. drei Basen zwischen Donor und Akzeptor (**DNA2** bzw. **DNA8**) und den entsprechenden Kontrollsträngen (**DNA3** bzw. **DNA9**) am stärksten ausgeprägt ist. Die Maxima der Duplexe **DNA2** und **DNA3** sind im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsträngen leicht rot verschoben, was auf eine bessere Stapelung mit den DNA-Basen in den beiden Einzelsträngen **ssDNA2** und **ssDNA3** hinweist. Das erklärt die erhöhte Fluoreszenzintensität und die geringfügig höhere Lebenszeit τ der Einzelstränge gegenüber der Duplexe (vgl. Tabelle 5-1).

Interessanterweise sind die Emissionsmaxima der Einzelstränge und Duplexe von **DNA6** und **DNA7** nahezu identisch, während die Maxima der Duplexe **DNA8** und **DNA9** verglichen mit denen der Einzelstränge leicht zu kürzeren Wellenlängen verschoben sind. Die Verschiebung der Emissionsmaxima, verglichen mit den Einzelsträngen, ist in den ethidiummarkierten Duplexen, die 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor enthalten (**DNA2**, **DNA6** und **DNA8**) stärker ausgeprägt. Dies deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von 5-Nitroindol Einfluss auf das Interkalationsverhalten von Ethidium hat. Das lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass 5-Nitroindol keine Wasserstoffbrücken zu der Gegenbase ausbilden kann.^[105] Das hat zum einen Auswirkungen auf die Schmelztemperatur der Duplexe,^[105] die bei den Ladungstrans-

ferduplexen (**DNA2**, **DNA6** und **DNA8**) um ca. 8 °C niedriger liegt, als bei den Kontrollduplexen (**DNA3**, **DNA7** und **DNA9**). Zum anderen ergibt sich eine Störung der DNA-Struktur in der Umgebung von Ethidium, die wahrscheinlich dafür verantwortlich ist, dass Ethidium unterschiedlich gut in den Basenstapel interkalieren kann. Erst ab einer Distanz von drei Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor scheint die Anwesenheit von 5-Nitroindol keine Auswirkungen auf das Interkalationsverhalten von Ethidium zu haben.

Auf die Gesamtkonformation der Duplexe hat die Anwesenheit von 5-Nitroindol keinen Einfluss, wie Zirculardichroismus-Spektren (CD-Spektren) von **DNA2-DNA9** zeigen. Bei allen Doppelsträngen handelt es sich um die typische Konformation einer B-DNA. Abb. 5-14 zeigt die CD-Spektren von **DNA6** und **DNA7** stellvertretend für die restlichen Duplexe. Die strukturelle Störung tritt daher wahrscheinlich nur lokal auf, so dass sie durch CD-Spektroskopie nicht detektiert werden kann.

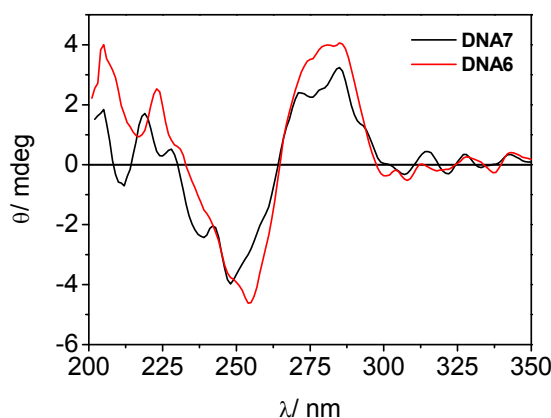
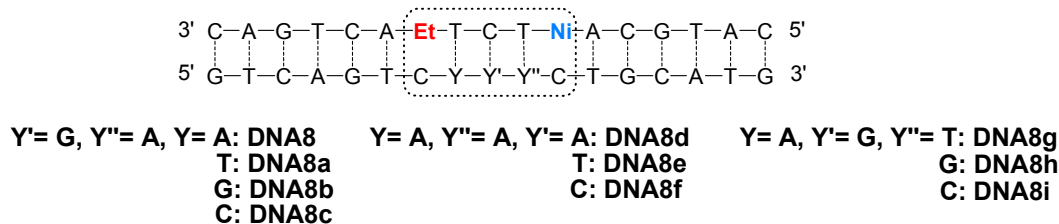
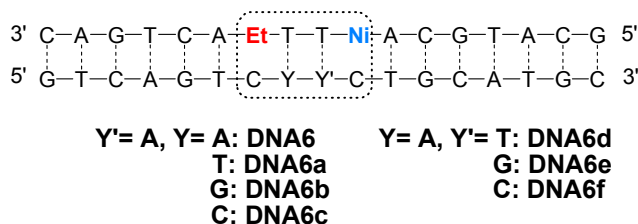
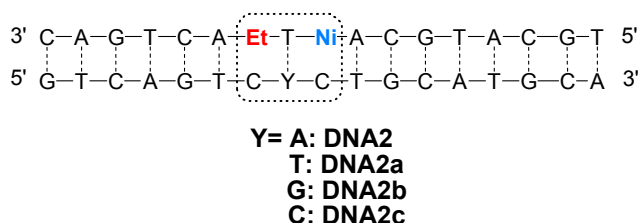


Abb. 5-14: CD-Spektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor (**DNA6**, **DNA7**); 5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 25 °C.

5.1.3. Anwendung des DETEQ-Konzepts im Donor-Akzeptor-Paar Ethidium-Nitroindol

Wie bereits in Kapitel 5.1.2 erwähnt, weisen oxidativer und reduktiver Ladungstransfer ähnliche Abstandsabhängigkeiten und Ladungstransferraten auf.^[30] Da von *Valis et al.*^[27, 28] gezeigt wurde, dass sich oxidativer Ladungstransfer zwischen Ethidium und 7-Deazaguanin zur erfolgreichen Detektion von Basenfehlpaarungen eignet, soll diese Methode nun für reduktiven Elektronentransfer zwischen Ethidium und 5-Nitroindol untersucht werden.

Zur Überprüfung des DETEQ-Konzepts im Ethidium-Nitroindol-System wurden die Duplexsätze **DNA2/DNA2a-c**, **DNA4/DNA4a-f**, **DNA6/DNA6a-f** und **DNA8/DNA8a-i** hergestellt und mittels UV/Vis- und Fluoreszenzspektroskopie vermessen (vgl. Kapitel 7.4.6.1).



Liegt ein Basenpaar zwischen Ethidium und 5-Nitroindol (**DNA2/DNA2a-c**) erhält man geringfügig höhere Emissionsintensitäten der fehlgepaarten Duplexe **DNA2a-c** und des Einzelstrangs **ssDNA2** verglichen mit **DNA2** (vgl. Abb. 7-2).

In den Duplex-Sätzen **DNA6/DNA6a-f**, die zwei Basenpaare zwischen Ethidium und 5-Nitroindol enthalten, ist ein Anstieg der Fluoreszenz vom Einzel- zum Doppelstrang deutlich zu erkennen. Basenfehlpaarungen beeinflussen die Fluoreszenzeigenschaften von **DNA6** in sehr unterschiedlichem Ausmaß: Während eine Fehlpaarung unmittelbar neben dem Ethidium-Chromophor (**DNA6a-c**) nur sehr geringen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität hat, steigt die Emission bei einer Fehlpaarung unmittelbar neben 5-Nitroindol (**DNA6d-f**) teilweise stark an (vgl. Abb. 7-3).

Auch über drei Basenpaare zwischen Ethidium und 5-Nitroindol (**DNA8/DNA8a-i**) ist ein Anstieg der Fluoreszenz vom Einzel- zum Doppelstrang zu erkennen. Allerdings haben Einzelbasenfehlpaarung in den Duplex-Sets **DNA8/DNA8a-i** einen unterschiedlichen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität, da eine Fehlpaarung in zwei Doppelsträngen einen leichten

Fluoreszenzanstieg hervorruft (**DNA8c** und **DNA8i**), wobei die Fluoreszenz in den restlichen fehlgepaarten Duplexen gelöscht wird (vgl. Abb. 7-4).

Die bisher vorgestellten Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das Ethidium-Nitroindol-System zur Detektion aller möglichen Einzelbasenfehlpaarungen mittels stationärer Fluoreszenzmessung nicht geeignet ist. Bekanntermaßen reagiert stationäre Fluoreszenz sehr empfindlich auf äußere Faktoren wie Absorption, Streuung oder Intensitätsschwankung der Anregungslichtquelle,^[65] was teilweise erhebliche Auswirkungen auf die gemessenen Fluoreszenzintensitäten hat und damit die Messergebnisse verfälschen kann. Die Messung von Fluoreszenzlebenszeiten hingegen erfolgt unabhängig von absoluten Signalintensitäten und wird daher durch die genannten Faktoren nicht beeinträchtigt.^[65] Aus diesem Grund wurden die Fluoreszenzlebenszeiten der Duplexsätze **DNA2/DNA2a-c**, **DNA6/DNA6a-f** und **DNA8/DNA8a-i** mittels Phasenmodulationsmethode bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse befinden sich in Tabelle 7-24 (Kap. 7.4.6.1).

Wie bereits in Kapitel 5.1.2 beschrieben, verwendet man als Maß für die Fluoreszenzlöschung bei stationären Fluoreszenzmessungen den F_q -Wert, der nach Gleichung 5-1 berechnet wird. Zur Auswertung des Lebenszeitenassays wird eine vergleichbare Größe benötigt, die angibt, in welchem Maß sich die durchschnittliche Fluoreszenzlebenszeit des fehlgepaarten Duplexes (τ_F) verglichen mit der des korrekt gepaarten Doppelstrangs (τ_F^0) aufgrund von Ladungstransferprozessen verändert. Diese Größe wird hier als F_t -Wert bezeichnet und analog zum F_q -Wert nach folgender Gleichung berechnet:

$$F_t = 1 - \frac{\tau_F}{\tau_F^0} \quad \text{Gleichung 5-3}$$

Für den Ladungstransfer über den Abstand von einer Base fanden *Valis et al.*,^[30] wie bereits in Kapitel 5.1.2 erwähnt, eine Zeitkomponente im ps-Bereich, während über größere Distanzen und für die Kontrollduplexe nur Werte im ns-Bereich ermittelt werden konnten. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Systeme liegt die Vermutung nahe, dass es auch bei dem hier untersuchten Duplex **DNA2** diese schnelle Zeitkomponente gibt. Die hier verwendete Phasenmodulationsmethode deckt allerdings nur den ns-Bereich ab, Lebenszeiten auf einer schnelleren Zeitskala können nicht detektiert werden. Daher ist in diesem Fall ein Lebenszeitenassay erst ab einer Distanz von zwei Basenpaaren zwischen Ethidium und 5-Nitroindol sinnvoll.

Betrachtet man die Auftragung der F_q -Werte von **DNA2a-c** (Abb. 5-15, links) so erkennt man, dass die Fluoreszenzintensität bei einer Basenfehlpaarung zwischen Ethidium und 5-Nitroindol in allen fehlgepaarten Duplexen höher liegt als im korrekt gepaarten Duplex

DNA2, im besten Fall jedoch lediglich um 25 %. Aufgrund dieses nur sehr geringen Unterschieds und der Tatsache, dass auch der Einzelstrang eine ähnlich hohe Fluoreszenzintensität aufweist, ist eine verlässliche Basenfehlpaarungsdiskriminierung nicht möglich. Dies ist auch verständlich, wenn man berücksichtigt, dass die lokale Struktur der Duplexe aufgrund des geringen Abstands zwischen den artifiziellen Basen Ethidium und 5-Nitroindol, die keine Wasserstoffbrückenbindungen zu den Gegenbasen ausbilden können, deutlich gestört wird.^[105, 106] Eine weitere Störung durch eine Basenfehlpaarung hat erwartungsgemäß einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die Fluoreszenzintensität.

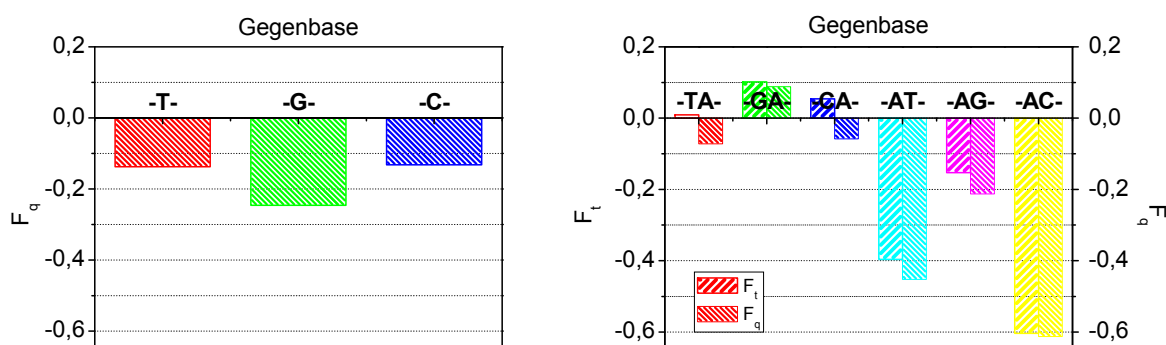


Abb. 5-15: Berechnete F_q -Werte der Fluoreszenzlöschung für **DNA2a-c** (links) sowie F_{1-} und F_q -Werte für **DNA6a-f** (rechts).

Abb. 5-15 (rechts) zeigt eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse aus stationären und zeitaufgelösten Fluoreszenzmessungen für die Duplexsätze **DNA6a-f**. Die Auftragung veranschaulicht den geringen Einfluss einer Basenfehlpaarung unmittelbar neben Ethidium auf die Fluoreszenzintensität und -lebenszeit der Duplexe **DNA6a-c** sowie den teilweise starken Anstieg beider Parameter bei einer Fehlpaarung unmittelbar neben 5-Nitroindol (**DNA6d-f**). Erstaunlicherweise stehen diese Ergebnisse in deutlichem Kontrast zu denen von *Valis et al.*^[27], die 7-Deazaguanin als Ladungsakzeptor im DETEQ-System mit Ethidium verwendet haben. In Ethidium-Deazaguanin-Duplexen wurde die Fluoreszenz von Ethidium in Gegenwart einer Basenfehlpaarung stark gelöscht, es wurden F_q -Werte von bis zu 0,89 erhalten.^[28] Da beide Systeme ähnliche Abstandsabhängigkeiten und Ladungstransferraten aufweisen, sind die gravierenden Unterschiede in den F_q -Werten wahrscheinlich strukturell bedingt, da 5-Nitroindol im Gegensatz zu 7-Deazaguanin keine Wasserstoffbrückenbindungen zur Gegenbase C ausbilden kann.^[105, 106] Das führt zu weniger stabilen Duplexen, was durch eine Erniedrigung der Schmelztemperaturen um ca. 8 °C in Gegenwart von 5-Nitroindol und um weitere 4 °C- 6 °C bei einer zusätzlichen Basenfehlpaarung (**DNA6a-f**) gezeigt wird (Tabelle 7-19, Kapitel 7.4.6.1). Die Anwesenheit von 7-Deazaguanin hingegen hat keinen

Einfluss auf die Schmelztemperatur der Duplexe, selbst eine zusätzliche Basenfehlpaarung wirkt sich kaum darauf aus.^[28]

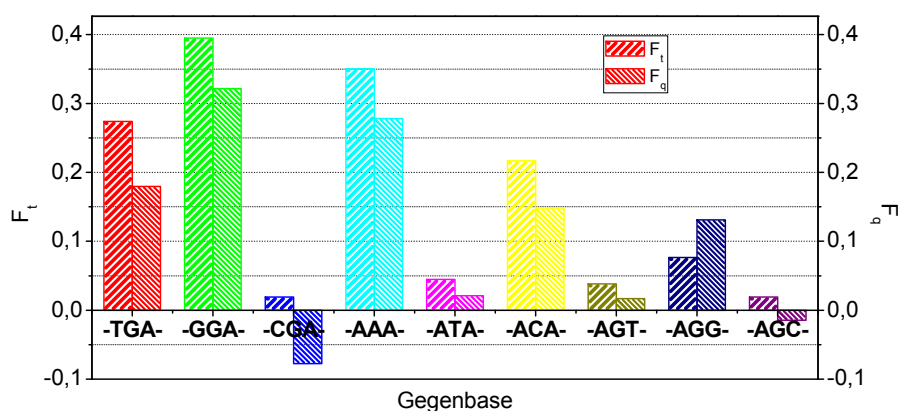


Abb. 5-16: Berechnete F_t - und F_q -Werte der Fluoreszenzlöschung für **DNA8a-i**.

Die Ergebnisse der stationären Fluoreszenzmessungen stimmen auch für die Duplexsätze **DNA8a-i** gut mit den Daten der zeitaufgelösten Fluoreszenzmessung überein, wie Abb. 5-16 zeigt. Allerdings fällt auf, dass eine Basenfehlpaarung hier, im Gegensatz zu den Duplexsätzen **DNA2a-c** und **DNA6d-f**, zu einer Verkürzung der Lebenszeit bzw. in den meisten Fällen zu einer Löschung der Fluoreszenz führt. Eine mögliche Erklärung für die Fluoreszenzlöschung und die Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit in Gegenwart einer Basenfehlpaarung, die auch *Valis et al.*^[27, 28] im DETEQ-Assay mit 7-Deazaguanin gesehen haben, liefern zeitaufgelöste Studien an DNA-Duplexen, die eine Ethidiummodifikation verknüpft durch einen Linker enthalten. Darin konnte gezeigt werden, dass das Ethidium-Derivat eine Reorganisationszeit von ca. 75 ps benötigt, um optimal in den Basenstapel interkalieren zu können. Diese Konformation ist die Voraussetzung für den schnellen Ladungstransfer mit einer Geschwindigkeit von ca. 5 ps.^[131, 136] In den Experimenten von *Valis et al.* und in dem hier vorgestellten Assay wurde Ethidium als starres Nukleosid in die DNA-Stränge eingebaut. Im Doppelstrang **DNA8**, in dem sich drei Basenpaare zwischen Ethidium und 5-Nitroindol befinden, ist die lokale strukturelle Störung und damit auch die Flexibilität des Doppelstrangs geringer als in den Duplexsätzen **DNA2/DNA2a-c** und **DNA6/DNA6a-f**. Daher ist es denkbar, dass eine Umorientierung des photoangeregten Ethidiums im korrekt gepaarten Duplex **DNA8** unterbunden wird. Durch eine Basenfehlpaarung wird die konformationelle Flexibilität vergrößert, was zu einem effizienteren Ladungstransfer und damit zu einer Löschung der Fluoreszenz und einer Verkürzung der Fluoreszenzlebenszeit in den fehlgepaarten Duplexen **DNA8a-i** führt. Der

Lebenszeitenassay liefert insgesamt ein einheitlicheres Bild, da alle durchschnittlichen Lebenszeiten der Duplex-Sets **DNA8a-i** durch eine Basenfehlpaarung verkürzt werden. Allerdings erhält man auch hier nur F_t -Werte zwischen 2 % (**DNA8c**, **DNA8i**) und 40 % (**DNA8b**), wodurch eine eindeutige und verlässliche Detektion jeder möglichen Basenfehlpaarung nicht möglich ist.

Grundsätzlich erfüllt die Kombination aus Ethidium als Ladungsdonor und 5-Nitroindol als Elektronenakzeptor die Anforderungen des DETEQ-Konzepts. In Duplexen mit einem oder zwei Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor können allerdings nur bestimmte Einzelbasenfehlpaarungen durch einen Anstieg der Fluoreszenz bzw. einer Verlängerung der Fluoreszenzlebenszeit detektiert werden, während andere Einzelbasenfehlpaarungen in Duplexen mit 3 Basenpaaren zwischen Ethidium und 5-Nitroindol eine Fluoreszenzlöschung und eine Verkürzung der Lebenszeit hervorrufen. Unabhängig von den Vorzeichen liegen fast alle berechneten F_q - und F_t -Werte unter 50 %. Ein DNA-Assay zur SNP-Detektion kann aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse nicht entwickelt werden, da eine erfolgreiche und v. a. verlässliche Detektion aller möglichen Einzelbasenfehlpaarungen vermutlich bedingt durch die strukturelle Störung des Systems nicht möglich ist.

5.2. Methylviologen als nukleosidischer Elektronenakzeptor

5.2.1. Hintergrundinformationen zu Methylviologen

Methylviologen (**V**; *N,N'*-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid, Handelsname: *Paraquat*, Abb. 5-17) und dessen Derivate stellen sehr potente Herbizide dar, deren Wirkung darin besteht, dass sie Elektronen aus der photosynthetischen Elektronentransportkette abziehen und dadurch die Photosynthese der Pflanze hemmen. Aufgrund ihres starken Oxidationsvermögens führen sie so bereits in geringen Dosen innerhalb kurzer Zeit zum Absterben der Pflanzen. Angesichts der kostengünstigen Ausgangsstoffe und der einfachen synthetischen Zugänglichkeit dieser Derivate entwickelten sie sich zu sehr gefragten Pflanzenschutzmitteln.^[412-415] Allerdings handelt es sich bei den meisten dieser Verbindungen aufgrund ihrer guten Wasserlöslichkeit und ihrer Toxizität auch für höhere Organismen^[416] um stark wassergefährdende Stoffe. In den westlichen Industriestaaten werden diese umweltgefährdenden Substanzen daher nicht mehr verwendet. Darüber hinaus steht Methylviologen

seit Anfang der 90er Jahre im Verdacht, ein Risikofaktor für die Erkrankung an Parkinson zu sein.^[417, 418]

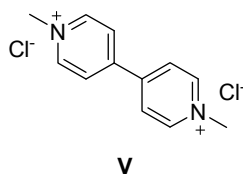


Abb. 5-17: *N,N'*-Dimethyl-4,4'-bipyridiniumdichlorid (Methylviologen, V).

Ursprünglich wurden Methylviologen-Derivate als Redox-Indikatoren zur Erforschung biologischer Systeme entwickelt,^[415, 419] da sie unter den organischen Verbindungen eines der niedrigsten Redoxpotentiale ($E_{\text{red}}(\text{V}^{2+}/\text{V}^{•+}) = -0,3 \text{ V}$)^[31] aufweisen. Aufgrund der reversiblen Elektronenübertragung können diese Substanzen Elektronen von einer Verbindung aufnehmen und an eine andere weitergeben und werden daher auch als sog. Redox-Mediatoren zur Untersuchung biologischer Systeme^[281, 420] und in der Sensorentwicklung eingesetzt.^[421, 422]

Auch zur Erforschung von reduktivem Elektronentransfer in DNA wurde Methylviologen bereits verwendet. Aufgrund seines Redoxpotentials von $E_{\text{red}}(\text{V}^{2+}/\text{V}^{•+}) = -0,3 \text{ V}$ ^[31] ist es in der Lage photoangeregtes Ethidium mit einem Potential von $E_{\text{ox}}^*(\text{Et}^{•2+}/\text{Et}^{*+}) = -0,5 \text{ V}$ ^[408] zu oxidieren. Nach *Rehm-Weller* (vgl. Kap. 3.3.1) ergibt sich für den reduktiven Elektronentransfer von E zu V^{2+} eine Triebkraft ΔG von ca. $-0,1 \text{ eV}$.

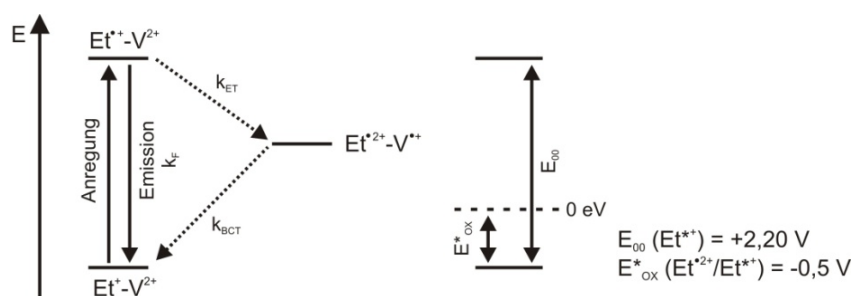


Abb. 5-18: Photoangeregtes Ethidium als Reduktionsmittel im System Ethidium-Methylviologen. Erläuterungen: k_{ET} : Rate des reduktiven Elektronentransfers, k_{BCT} : Rate des Rückladungstransfers.

1986 zeigten *Fromherz et al.*,^[225] dass die Fluoreszenz von in DNA interkaliertem Ethidiumbromid durch Zugabe von Methylviologen-dichlorid-trihydrat (V) gelöscht wird (vgl. Kapitel 3.3). Diese Fluoreszenzlöschung ist die Folge des reduktiven Elektronentransfers von photoangeregtem Ethidiumbromid auf den externen *Quencher* Methylviologen. Aufgrund dessen Struktur, in der die beiden Pyridinium-Ringe in einem Winkel von ca. 40° zueinander stehen, kann das Methylviologen-Dikation nicht in den Basenstapel interkalieren.^[423, 424] Die

elektrostatische Anziehung zwischen dem Methylviologen-Dikation und dem negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA mit einer Bindungskonstanten von $1,8 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ist genügend stark, um photoinduzierten Elektronentransfer zu ermöglichen.^[225, 226, 407, 408]

Das Methylviologen-Dikation zeigt keine Absorptionsbande im sichtbaren Wellenlängenbereich (vgl. Kapitel 5.2.2, Abb. 5-21). Sobald es aber ein Elektron aufnimmt und zum radikalischen Monokation wird, färbt es sich tiefblau ($\lambda_{\text{max}} = 603 \text{ nm}$, $\epsilon_{603} = 12000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).^[32] Dieses Radikal ist aufgrund seiner Mesomeriestabilisierung sehr langlebig und unter geeigneten Bedingungen (v. a. bei Sauerstoffausschluss) über längere Zeit auch in Lösung stabil. Neben der Bestimmung der Fluoreszenzlöschung eignet sich daher auch die Messung der transienten Absorption zur Detektion von reduktivem Elektronentransfer, wie *Shafirovich et al.*^[227] durch Zugabe von Methylviologen zu pyrenmodifizierter DNA zeigen konnten.

Der Schwachpunkt aller bisher durchgeführten Experimente ist die Tatsache, dass der Abstand zwischen Ladungsdonor und Methylviologen nicht genau bekannt ist, da Methylviologen bis zum jetzigen Zeitpunkt nur als externer *Quencher* zugegeben wurde. *Shafirovich et al.*^[227] konnten durch Variation der Methylviologen-Konzentration einen Elektronentransfer vom Pyren über eine Distanz von ca. 40 Å abschätzen. Zum vollständigen Verständnis des reduktiven Elektronentransfers auf Methylviologen ist die Verwendung eines definierten Systems jedoch essentiell.

In der Regel nutzt man zur Herstellung eines entsprechenden Systems die automatisierte DNA-Festphasensynthese um sowohl Donor, als auch Akzeptor in einem vorher festgelegten Abstand als artifizielle Base bzw. in Form eines modifizierten Nukleosids in den DNA-Strang einzubauen. Die stark basischen Bedingungen, die zur Abspaltung der DNA von der festen Phase benötigt werden, sind jedoch mit Bipyridinderivaten nicht vereinbar, wie die aus der Literatur bekannten Zerfallsreaktionen in Abb. 5-19 zeigen.^[32, 425, 426] Bei einem $\text{pH} > 8$ finden zwei Nebenreaktionen statt: zum einen die Desalkylierung (I) und zum anderen die Hydroxylierung (II) der Dialkylverbindung A. Durch Disproportionierung entsteht anschließend das tiefblau gefärbt Monoradikalkation zusammen mit chinoiden Nebenprodukten, die eine charakteristische intensiv blaue Fluoreszenz aufweisen.

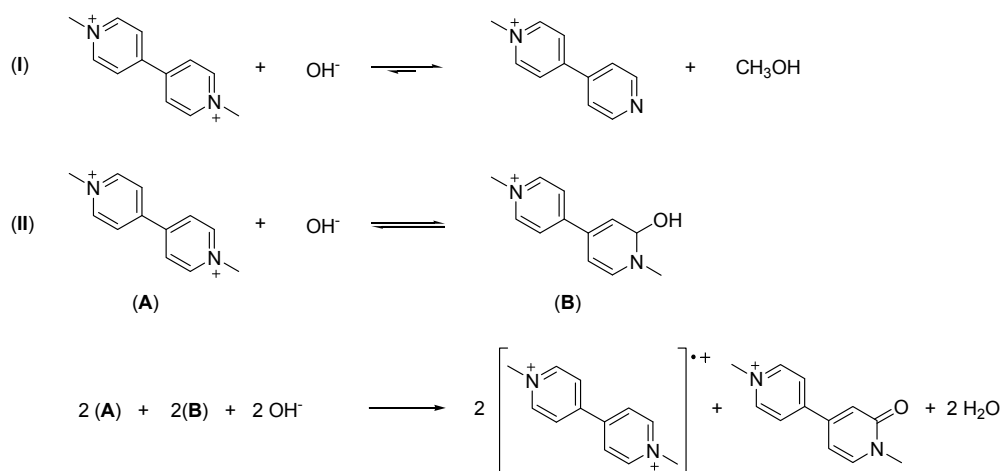


Abb. 5-19: Schematische Darstellung der im Basischen ablaufenden Zerfallsreaktionen dialkylierter Bipyridine.^[426] Reaktion I führt zur Desalkylierung, Reaktion II zur Hydroxylierung der dikationischen Verbindung. Das hydroxylierte Produkt B disproportioniert mit A zu dem tiefblau gefärbten Monoradikalkation und chinoiden Bipyridinderivaten.

Der Einbau von Methylviologen-Derivaten als artifizielle Nukleoside mittels konventioneller DNA-Festphasensynthese scheint aufgrund ihrer Basenlabilität nicht möglich zu sein.^[427] In Veröffentlichungen, die eine Synthese derartig modifizierter DNA-Stränge beschreiben,^[428, 429] fehlt die eindeutige massenspektrometrische Analyse der dargestellten modifizierten Oligonukleotide.

5.2.2. Synthese des azidmodifizierten Methylviologen-Derivats 42 und spektroelektrochemische Charakterisierung von 41

Um die Problematik der Basenlabilität zu umgehen und dennoch ein exakt definiertes System aus photoinduzierbarem Ladungsdonor und Methylviologen als Ladungsakzeptor zu erhalten, sollen die Oligonukleotide postsynthetisch mit Methylviologen modifiziert werden. Wie bereits in Kapitel 3.6 erwähnt, eignet sich eine kupfer-(I)-katalysierte Version der *Huisgen* [3+2]-Cycloaddition zu Triazolen,^[275, 276] die sog. kupfer-(I)-katalysierte Azid-Alkin-Cycloaddition (CuAAC),^[272, 274, 430] die zur Gruppe der Klickreaktionen gehört,^[273] hervorragend zur postsynthetischen Modifizierung von Oligonukleotiden.^[267, 277, 291-294, 431] Dazu benötigt man DNA-Stränge, die Alkine oder Azide als funktionelle Gruppen enthalten. Die Herstellung azidmodifizierter DNA durch Standardfestphasensynthese ist allerdings äußerst schwierig, da Azide durch die Phosphor-(III)-Spezies der Phosphoramidite relativ leicht

reduziert werden.^[277, 297] Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Azidmodifikation durch eine dreistufige Synthese an das Viologenderivat **42** angebracht, wie Abb. 5-20 zeigt.

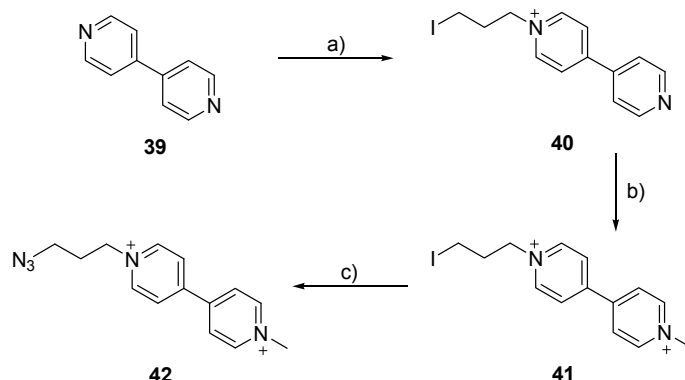


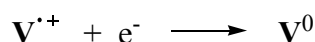
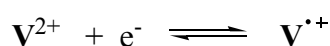
Abb.5-20: Syntheschema zur Darstellung des azidmodifizierten Viologens **42**: a) Diiodpropan (12,8 eq.), 1 h Ultraschall, 48 h, RT (89 %); b) Iodmethan (8,6 eq.), MeCN, 24 h, RT (46 %); c) NaN_3 (3 eq.), H_2O , 14 h, 80 °C (90 %).

Als Edukt der Synthese dient kommerziell erhältliches Bipyridin (**39**), das durch Umsetzung mit 1,3-Diiodpropan in das einfach alkylierte Derivat **40** überführt wird. 1,3-Diiodpropan dient bei dieser Reaktion zugleich als Lösungsmittel, aus dem das gewünschte Produkt aufgrund der deutlich höheren Polarität im Vergleich zum Edukt ausfällt. Dadurch wird zum einen eine Zweifach-Alkylierung verhindert, zum anderen wird das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite verschoben. Um das Ausfällen des Produkts zu vervollständigen, wird nach Reaktionsende Et_2O zugegeben. Gewöhnlich spielt es kaum eine Rolle, in welcher Reihenfolge die Alkylsubstituenten an den N-Positionen des Bipyridins eingeführt werden, da alkylsubstituiertes Bipyridin ein hinreichend reaktives Edukt für eine weitere Alkylierung darstellt.^[432, 433] In diesem Fall ist die Umsetzung mit 1,3-Diiodpropan als erstem Alkylierungsschritt allerdings unbedingt erforderlich, da *Mayer-Enthart* gezeigt hat, dass das Methylviologen-Derivat **41** aus methylsubstituiertem Bipyridiniumiodid nicht hergestellt werden kann.^[426]

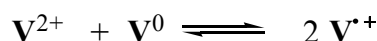
Im nächsten Schritt erfolgt eine Methylierung an der noch freien N-Position von Verbindung **40** mit Methyljodid in MeCN. Die zweifache N-Alkylierung des Bipyridins ist erforderlich, um die leichte Reduzierbarkeit des Viologen-Derivats zu erhalten.^[434, 435] Die benötigte Azid-Funktion wird in der letzten Stufe in einer nukleophilen Substitutionsreaktion mit NaN_3 eingeführt.

Das durch Reduktion entstehende Methylviologenradikal von **41** wurde mittels Cyclovoltammetrie (CV) und spektroelektrochemischer UV/Vis-Absorptionsmessungen

analysiert. Das azidmodifizierte Derivat **42** wurde für diese Untersuchungen nicht verwendet, da der Azid-Rest ebenfalls reduziert werden kann^[436] und daher Probleme bei der Interpretation der Ergebnisse auftreten können. Das Cyclovoltogramm (Abb. 5-21, links) von Verbindung **41** zeigt auf Seiten der Reduktion die beiden für Methylviologen typischen Signale, eines bei -0,75 V und das andere bei -1,15 V (gg. Ferrocen).^[437, 438] Diese Potentiale können gemäß *Lezna et al.*^[437] und *Blubaugh et al.*^[438] den beiden folgenden Ein-Elektronen-Übertragungen zugeordnet werden.



Lezna et al.^[437] haben darüber hinaus herausgefunden, dass die erste Reaktion vollständig reversibel abläuft, während das zweifach reduzierte Methylviologen-Derivat V^0 , das bei -1,15 V gebildet wird, nur in Gegenwart von V^{2+} zurückoxidiert werden kann:



Spektroelektrochemische UV/Vis-Absorptionsmessungen (Abb. 5-21, rechts) zeigen, dass die Methylviologen-Absorption bei 247 nm mit sinkendem Potential abnimmt, während zunächst zwei neue Banden bei 397 nm und 603 nm entstehen, die laut *Watanabe et al.*^[439], *Kosower et al.*^[440] und *Blubaugh et al.*^[438] dem einfach reduzierten $\text{V}^{•+}$ zugeordnet werden können. Diese beiden Banden bleiben bei weiter sinkendem Potential über einen Bereich von ca. 150 mV konstant. Wird das Schwellenpotential für die zweite Ein-Elektronen-Übertragung erreicht, wird die Bande bei ca. 400 nm breiter und die Absorption bei 603 nm beginnt abzunehmen, bis sie schließlich bei weiter sinkendem Potential komplett verschwindet. Das ockerfarbene Spektrum in Abb. 5-21 (rechts) kann nach *Watanabe et al.*^[439] dem zweifach reduzierten ungeladenen Methylviologen-Derivat V^0 zugeordnet werden.

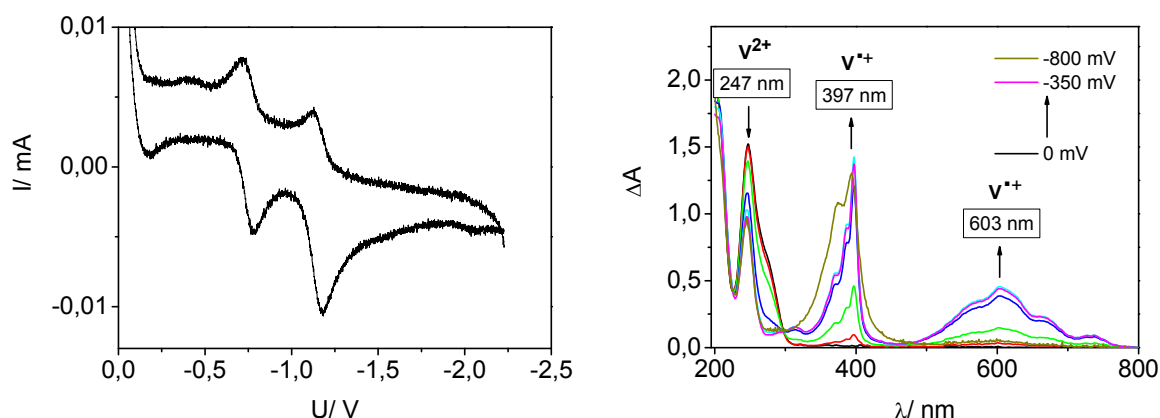


Abb.5-21: Cyclovoltogramm (links) und spektroelektrochemische Absorptionsmessung (rechts) von **41**, Reduktion, $c(\mathbf{41}) = 38 \mu\text{M}$ in MeCN, Leitsalz: 150 mM NBu_4PF_6 . Die Cyclovoltammetriemessung wurde auf die Oxidation von Ferrocen zum Ferrocenium-Ion referenziert, während die Potentiale bei den spektroelektrochemischen Messungen nicht kalibriert wurden. Daher können die Werte nicht miteinander verglichen werden.

5.2.3. Synthese und spektroskopische Untersuchungen der Eigenschaften methylviologenmodifizierter Duplexe

Zur Einführung einer Alkin-Funktion in Oligonukleotide mittels Standardphosphoramiditchemie sind in der Literatur eine ganze Reihe modifizierter DNA-Bausteine beschrieben^[291, 302, 303] (vgl. Kapitel 3.6). Eine in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierte alkinmodifizierte Nukleobase ist der Uridin-Baustein **49**,^[293, 299, 441] der die Modifikation an der 2'-Position des Uridins trägt, wodurch eine Basenpaarung im Duplex erhalten bleibt.^[299] Der Phosphoramiditbaustein **49** wurde ausgehend von kommerziell erhältlichem Uridin (**43**) entsprechend der Literatur von *Grotli et al.* hergestellt.^[299, 441] Abb. 5-22 zeigt die einzelnen Syntheseschritte, die hier nur kurz zusammengefasst werden sollen.

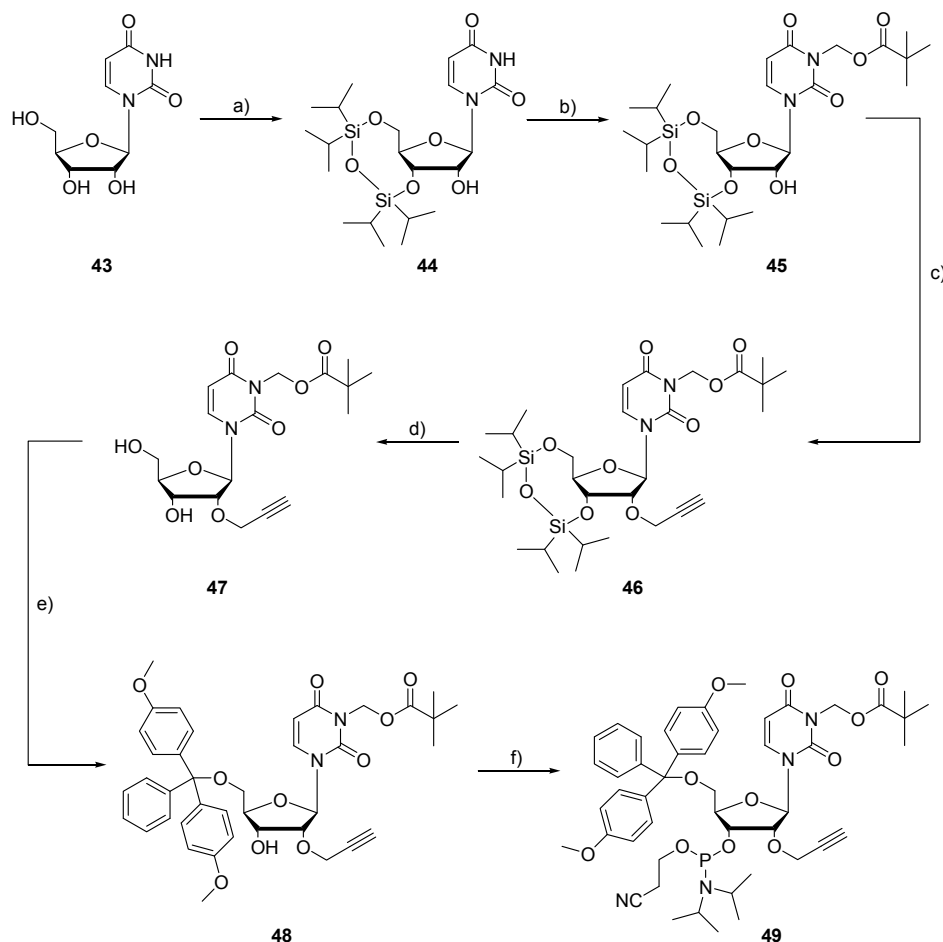


Abb.5-22: Syntheschema zur Darstellung des alkinylmodifizierten Uridin-Bausteins **49**:^[299, 441, 442] a) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyldisiloxan (1,1 eq.), Pyridin, 6 h, RT (73 %); b) Pivaloylmethylchlorid (10 eq.), TBAHS (0,23 eq.), CH_2Cl_2 / Na_2CO_3 , 48 h, RT (69 %); c) Propargylbromid (1,5 eq.), BEMP (1,6 eq.), MeCN, 15 min. bei 0 °C, 90 min. bei RT (45 %); d) $\text{Et}_3\text{N} \cdot (\text{HF})_3$ (5 eq.), THF, 10 h, RT (88 %); e) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid (1,6 eq.), Pyridin, 16 h, RT (64 %); f) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit (1,2 eq.), DIPEA (2,5 eq.), CH_2Cl_2 , 3 h, RT (79 %).

Um eine selektive Modifizierung der 2'-OH-Gruppe des Uridins zu ermöglichen, ist es zunächst erforderlich, die 3'- und die 5'-OH-Position des Zuckers sowie die NH-Gruppe des Uracils mit Schutzgruppen zu versehen. Dazu wird im ersten Schritt eine von *Markiewicz*^[443] entwickelte cyclische Silyether-Schutzgruppe an die 3'- und die 5'-OH-Position der Ribose angebracht. An der N^3 -Position des Uracils wird eine basenlabile Pivaloyloxymethyl-Schutzgruppe (Pom) mit Hilfe des Phasentransferkatalysators TBAHS eingeführt, die nach der DNA-Synthese zeitgleich mit der Abspaltung der Benzoyl- und Isobutyl-Schutzgruppen und der Stränge vom Trägermaterial entfernt wird.^[299, 444] Durch Reaktion mit Propargylbromid erhält man anschließend die alkinylmodifizierte Nukleobase **46**, von der die *Markiewicz*-Schutzgruppe mit Hilfe eines Komplexes aus HF und Triethylamin im nächsten Schritt abgespalten wird.^[442] Um den modifizierten Uridin-Baustein in der automatisierten

DNA-Festphasensynthese einsetzen zu können, wurde die 5'-OH-Gruppe von Verbindung **47** mit der 4,4'-Dimethoxytritylschutzgruppe versehen und der Phosphoramiditbaustein **49** nach der Standardmethode mit 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit und DIPEA in CH_2Cl_2 erzeugt.^[441]

Das Phosphoramidit **49** wurde in MeCN gelöst und in den Synthesautomaten eingebracht. Um eine effiziente Kupplung zu gewährleisten, wurde der Baustein in einer Konzentration von 0,1 M eingesetzt, die Standard-Kupplungszeit von 96 s konnte beibehalten werden.

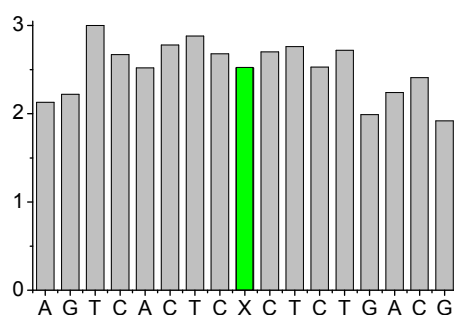
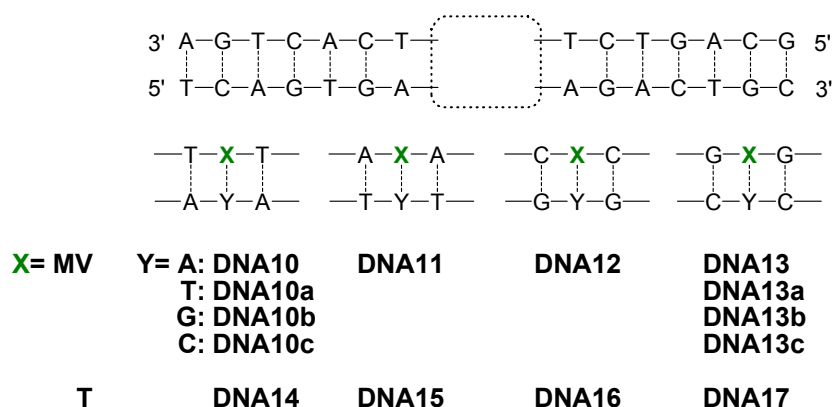


Abb. 5-23: Beispielhafte Darstellung des Tritylmonitors der Synthese von modifizierter ssDNA12, X= alkynyl-modifiziertes Uridin.

Abspaltung und Aufarbeitung der modifizierten Oligonukleotide erfolgten nach Vorschriften aus der Literatur.^[293, 445] Die Reinigung der Stränge mittels RP-HPLC wurde erst nach der Klickreaktion durchgeführt.

Zunächst wurde das alkynylmodifizierte Uridin in unterschiedlicher Basenumgebung in die DNA eingebaut (**DNA10-13**). Nach Entfernen der Schutzgruppen und Abspaltung von der festen Phase durch Ammoniak erfolgte die Methylviologen-Modifizierung mit Hilfe der CuAAC (vgl. Abb. 5-24).



Die Modifizierung der Einzelstränge **ssDNA10-ssDNA13** wurde entsprechend des in unserer Arbeitsgruppe von *Herzig* etablierten Protokolls durchgeführt.^[293, 445] Als Katalysator wurde Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat verwendet, der mit dem Liganden TBTA stabilisiert und durch Zugabe von Natriumascorbat vor einer Oxidation zu Cu(II) geschützt wurde. Als Medium diente eine 3:1-Mischung aus DMSO und *tert*-Butylalkohol. Das azidmodifizierte Methylviologen-Derivat **42** wurde in 15-fachem Überschuss zugegeben um eine vollständige Modifizierung der DNA-Stränge zu gewährleisten. Nach Schütteln des Reaktionsgemisches für 12 h wurde die methylviologenmarkierte DNA mit EtOH gefällt und anschließend mittels RP-HPLC aufgereinigt (vgl. Kapitel 7.4.3, Tabelle 7-16). Die erfolgreiche Klickreaktion wurde durch ESI-MS bestätigt.

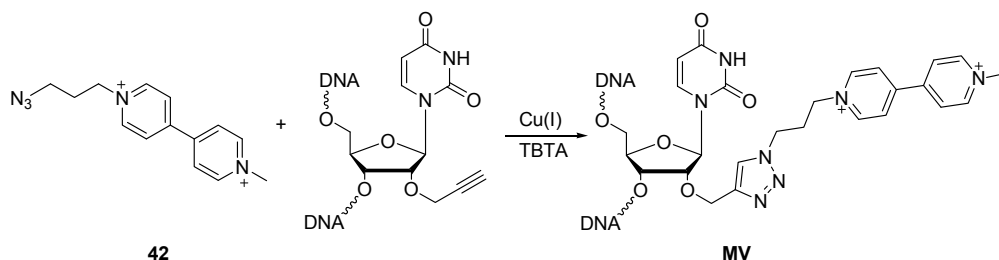


Abb. 5-24: Schematische Darstellung der postsynthetischen Anknüpfung des azidmodifizierten Methylviologen-Derivats **42** an alkynylmarkierte DNA mittels Klickchemie.

Zunächst wurde der Einfluss einer unterschiedlichen Basenumgebung auf die Absorption und die Schmelztemperatur der methylviologenmodifizierten DNA-Doppelstränge **DNA10-13** untersucht und mit den entsprechend unmodifizierten Duplexen **DNA14-17** verglichen.

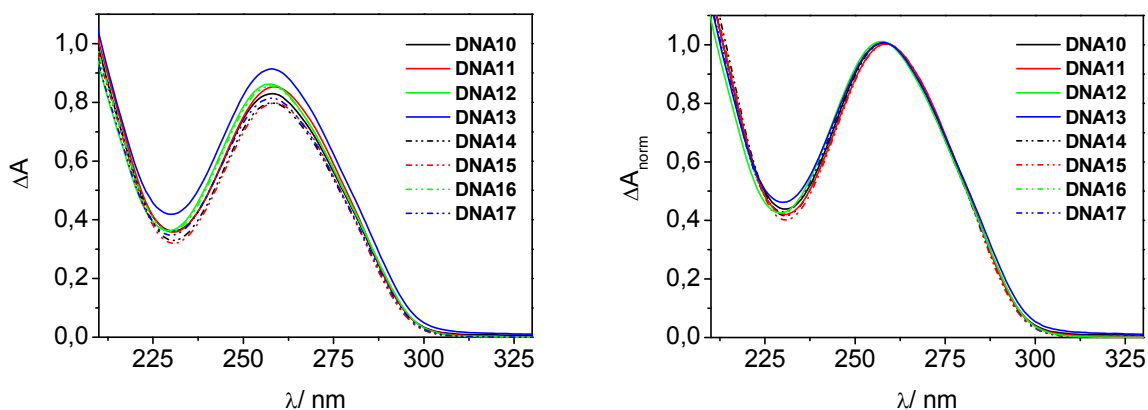


Abb. 5-25: Absorptionsspektren der methylviologenmodifizierten Duplexe **DNA10-13** im Vergleich zu den unmodifizierten Doppelsträngen **DNA14-17**; 2,5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 20 °C. links: absolute optische Dichte, rechts: normierte optische Dichte.

Aufgrund des höheren Extinktionskoeffizienten von methylviologenmodifiziertem Uridin ($\epsilon_{260} = 24000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} + 10100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) im Vergleich zu T ($\epsilon_{260} = 8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) liegen die optischen Dichten der methylviologen-markierten Duplexe **DNA10-13** geringfügig höher als die der unmodifizierten Doppelstränge **DNA14-17**. Eine spezifische Absorptionsbande von Methylviologen ist nicht erkennbar (Abb. 5-25, links). Betrachtet man die normierten optischen Dichten im Bereich zwischen 225 nm und 300 nm (Abb. 5-25, rechts), so erkennt man eine geringe Verbreiterung der DNA-Absorptionsbande zwischen 235 nm und 250 nm, sowie eine erhöhte Absorption bei 230 nm, die auf die Anwesenheit von Methylviologen zurück zu führen ist ($\epsilon_{230} = 31200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Die Basenumgebung beeinflusst die Absorption nicht, wie man anhand der Spektren deutlich erkennen kann.

Um die Auswirkungen der Methylviologen-Modifikation auf die Stabilität der Duplexe zu untersuchen, wurden die Schmelztemperaturen von **DNA10-13** bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt und denen von **DNA14-17** gegenübergestellt. Tabelle 5-3 zeigt, dass die Schmelztemperaturen der korrekt gepaarten methylviologenmarkierten Duplexe **DNA14-17** um max. $1,4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ niedriger liegen als die der entsprechenden unmodifizierten Doppelstränge **DNA10-13**. Demnach hat Methylviologen wenn überhaupt, nur geringfügige Auswirkungen auf die Stabilität der korrekt gepaarten Duplexe.

Tabelle 5-3: Schmelztemperaturen der methylviologenmodifizierten Duplexe **DNA10-13** und der unmodifizierten Duplexe **DNA14-17**: $2,5 \text{ }\mu\text{M}$ Duplex in 10 mM Na-P_i , pH 7, 250 mM NaCl , 260 nm , Heizrate $0,7 \text{ }^{\circ}\text{C/min}$, $10\text{-}90 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

DNA-Duplex	Smp [$^{\circ}\text{C}$]	DNA-Duplex	Smp [$^{\circ}\text{C}$]	ΔSmp [$^{\circ}\text{C}$]
DNA10	62,5	DNA14	63,0	-0,5
DNA10a	55,1			
DNA10b	52,9			
DNA10c	52,7			
DNA11	61,9	DNA15	62,0	-0,1
DNA12	65,6	DNA16	67,0	-1,4
DNA13	68,1	DNA17	68,0	+0,1
DNA13a	61,0			
DNA13b	62,0			
DNA13c	60,6			

Mit Hilfe von Schmelztemperaturmessungen wurde auch die Auswirkung der Gegenbase zum methylviologenmodifizierten Uridin auf die Stabilität der Duplexe untersucht. Dazu wurde

exemplarisch in **DNA10** und **DNA13** die Gegenbase zu Uridin variiert (**DNA10a-c**, **DNA13a-c**). Die Schmelztemperaturen verhalten sich in beiden Fällen sehr ähnlich. Verglichen mit den korrekt gepaarten Duplexen weisen die fehlgepaarten Doppelstränge eine um ca. 8 °C niedrigere Schmelztemperatur auf. Dies ist auch verständlich, wenn man berücksichtigt, dass Uridin nur mit Adenin als Gegenbase *Watson-Crick*-Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann.

Um sicher zu gehen, dass die Modifikation mit Methylviologen keine signifikante Störung der DNA-Konformation bewirkt, wurden CD-Spektren aller Duplexe gemessen. Die Spektren in Abb. 5-26 zeigen, dass es sich sowohl bei den korrekt gepaarten Duplexen **DNA10-13** (links) als auch bei den fehlgepaarten Doppelsträngen **DNA10a-10c** (rechts) um die typische Konformation einer B-DNA handelt. Die Methylviologen-Modifikation hat somit wie erwartet keinen Einfluss auf die Gesamtkonformation der Doppelstränge.

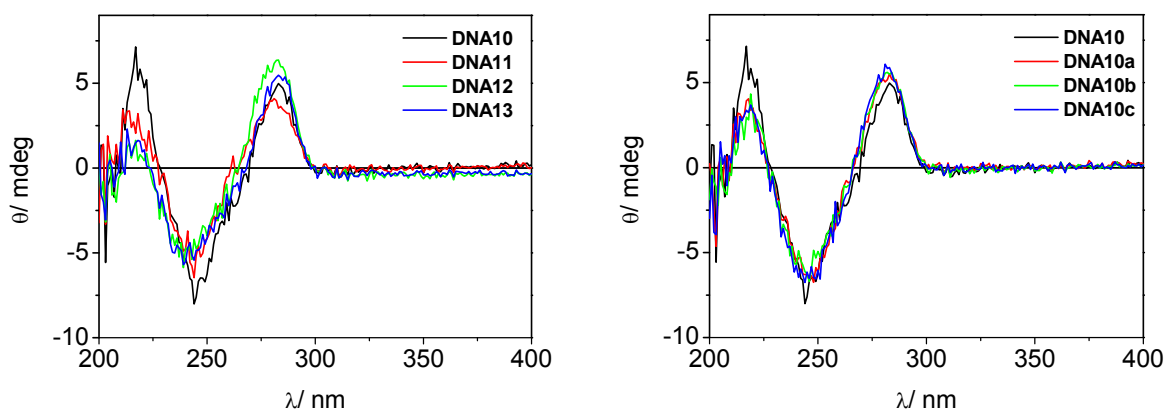


Abb. 5-26: CD-Spektren der korrekt gepaarten methylviologenmodifizierten Duplexe **DNA10-13** (links) und der fehlgepaarten Duplexe **DNA10-10c** (rechts): 2,5 μ M Duplex in 10 mM Na-P_i, pH 7, 20 °C.

Titrationsexperimente können als eine Art „Schnelltest“ benutzt werden, um herauszufinden, ob Ladungstransfer in DNA zwischen einem Donor und einem Akzeptor möglich ist. Verwendet man Ethidium als Ladungsdonor, gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten, diese Versuche durchzuführen. Entweder man titriert potentielle Ladungsakzeptoren mit ethidiummodifizierter DNA oder man setzt „freies“ Ethidiumbromid und akzeptor-modifizierte DNA ein. In unserer Arbeitsgruppe konnten *Amann et al.*^[103, 409] zeigen, dass die Fluoreszenz von ethidiummodifizierten Duplexen bei Zugabe von Methylviologen-dichlorid-trihydrat (**V**) stark gelöscht wird. Obwohl das doppelt positiv geladene Methylviologen-Kation nicht in den Duplex interkalieren kann (vgl. Kapitel 5.2.1), ist die Wechselwirkung mit

dem negativ geladenen Phosphatrückgrad der DNA so stark, dass photoinduzierter Elektronentransfer von interkaliertem Ethidium zu „freiem“ V^{2+} stattfindet.

Um herauszufinden, ob gebundenes Methylviologen trotz der geringeren Bewegungsfreiheit durch die kovalente Anbindung ebenso gut mit dem Doppelstrang wechselwirkt und somit Elektronentransfer durch DNA ermöglicht, wurde „freies“ Ethidumbromid mit dem methylviologenmodifizierten Duplex **DNA10** titriert. Als Referenz dient die Titration mit dem unmodifizierten Duplex **DNA14**.

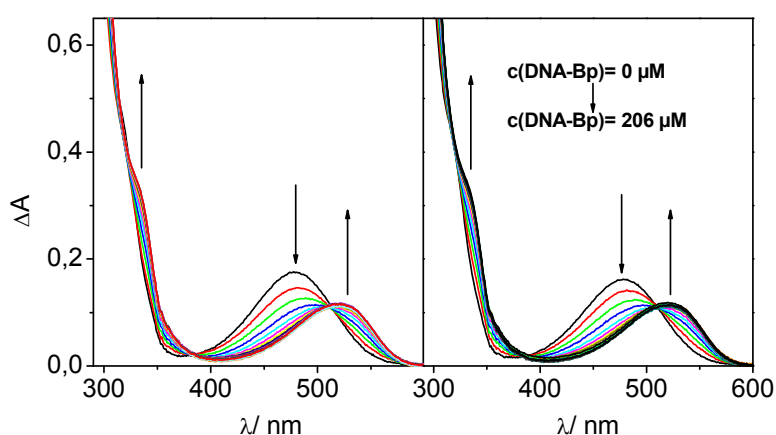


Abb. 5-27: Absorptionstitration von Ethidumbromid (**E**; $c = 30 \mu\text{M}$) mit unmodifiziertem Doppelstrang **DNA14** (links) und methylviologenmodifiziertem Duplex **DNA10** (rechts) in NaP_i -Puffer (10 mM, pH 7, 20 °C). Die Pfeile kennzeichnen die Änderung der Absorption bei steigender DNA-Konzentration.

Die Absorptionsspektren der Titration von Ethidumbromid mit methylviologenmodifizierter DNA (Abb. 5-27, rechts) sind nahezu identisch mit denen der Referenztitration (Abb. 5-27, links) und zeigen die für Ethidumbromid charakteristischen Merkmale: das Absorptionsmaximum verschiebt sich durch Zugabe von DNA von 479 nm auf 524 nm und man erhält isosbestische Punkte bei 511 nm, 385 nm und 323 nm (vgl. Kapitel 4.5.1). Dies ist auch verständlich, wenn man bedenkt, dass kovalent an DNA gebundenes Methylviologen lediglich geringfügigen Einfluss auf die Stabilität des Duplexes hat und die Interkalation von Ethidumbromid daher nicht beeinträchtigt.

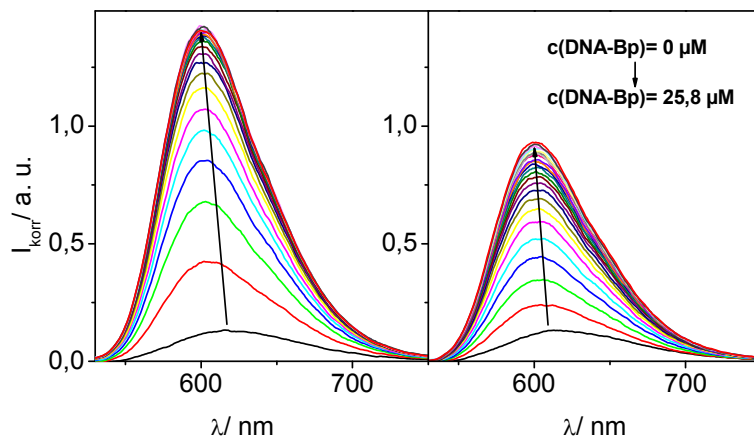


Abb. 5-28: Fluoreszenztitration von Ethidiumbromid (**E**; $c = 3 \mu\text{M}$) mit unmodifiziertem Duplex **DNA14** (links) und methylviologenmodifiziertem Doppelstrang **DNA10** (rechts) in NaP_i -Puffer (10 mM, pH 7, 20 °C; $\lambda_{\text{Exc}} = 510 \text{ nm}$). Die Pfeile kennzeichnen die Änderung der Fluoreszenz bei steigender DNA-Konzentration.

Auch die Fluoreszenzspektren zeigen die für Ethidiumbromid typische Blauverschiebung des Maximums von 615 nm auf 600 nm bei Zugabe von DNA. Allerdings hat die Anwesenheit von Methylviologen einen deutlichen Effekt auf die Fluoreszenzintensität, wie man in Abb. 5-29 erkennen kann. Während die Fluoreszenz von Ethidiumbromid bei Zugabe von unmodifizierter DNA auf das ca. 9-Fache ansteigt, erhält man bei der Titration mit methylviologenmodifizierter DNA lediglich einen beinahe 6-fachen Anstieg (Abb. 5-28 und Abb. 5-29). Da die Bedingungen bei beiden Messungen identisch waren, zeigt die Löschung der Fluoreszenz, dass reduktiver Elektronentransfer von interkaliertem Ethidiumbromid zu kovalent gebundenem Methylviologen stattfindet.

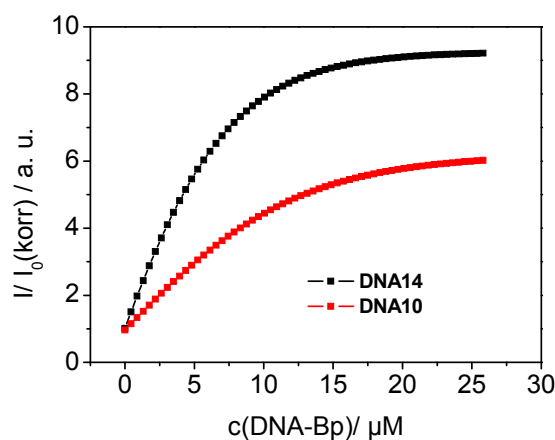


Abb. 5-29: Titrationskurven der Fluoreszenztitration von Ethidiumbromid (**E**; $c = 3 \mu\text{M}$) mit unmodifiziertem Duplex **DNA14** und methylviologenmodifiziertem Doppelstrang **DNA10** in NaP_i -Puffer (10 mM, pH 7, 20 °C; $\lambda_{\text{Exc}} = 510 \text{ nm}$).

Die Tatsache, dass die Fluoreszenz lediglich um ca. 30 % gelöscht wird, kann dadurch erklärt werden, dass mehrere Ethidiumbromid-Moleküle in einen Duplex interkalieren können, der jedoch nur eine Methylviologenmodifikation enthält. Aufgrund der Redoxpotentiale^[437, 438] (vgl. Kapitel 5.2.2) kann Methylviologen lediglich ein Elektron von photoangeregtem Ethidiumbromid^[408] aufnehmen, eine zweifache Reduktion ist nicht möglich. Letztendlich wird daher die Fluoreszenz von nur einem Ethidiumbromid-Molekül pro Doppelstrang gelöscht, während die Fluoreszenz der restlichen interkalierten Ethidiumbromid-Moleküle erhalten bleibt, was insgesamt zu der vergleichsweise geringen Fluoreszenzlöschung führt.

5.2.4. Vergleich des reduktiven Ladungstrfers im Donor-Akzeptor-Paar Ethidium-Methylviologen mit Ethidium-Nitroindol

Mit Hilfe der Titrationsexperimente aus Kapitel 5.2.3 konnte gezeigt werden, dass reduktiver Elektronentransfer zwischen interkaliertem Ethidiumbromid und kovalent gebundenem Methylviologen stattfindet. Allerdings kann man aus diesen Versuchen noch keine Rückschlüsse bezüglich der Effizienz und der Abstandsabhängigkeit des Ladungstrfers ziehen. Daher wurden in Anlehnung an die Ladungstrferexperimente mit Ethidium-Nitroindol-DNA die ethidiummodifizierten Oligonukleotidsequenzen **ssDNA18**, **ssDNA19** und **ssDNA20** synthetisiert und mit **ssDNA12** hybridisiert, um Duplexe zu erhalten, in denen sich Methylviologen ein bis drei Basenpaare entfernt vom Ethidium befindet. Der Einbau von Ethidium und Methylviologen in einen DNA-Strang war nicht möglich, da Vorexperimente gezeigt haben, dass Ethidium mit den Reaktionsbedingungen, die für die Klickchemie benötigt werden, nicht kompatibel ist.^[405]



Ebenso wie im System Ethidium-Nitroindol unterscheiden sich die Absorptionsspektren der ethidium- und methylviologenhaltigen Duplexe kaum von denen der ethidiummodifizierten Einzel- und Doppelstränge. Die Absorptionsmaxima aller untersuchten Stränge liegen auch

hier im Bereich zwischen $\lambda = 525$ nm und 530 nm. Abb. 5-30 zeigt exemplarisch die Absorptionsspektren von **DNA19**.

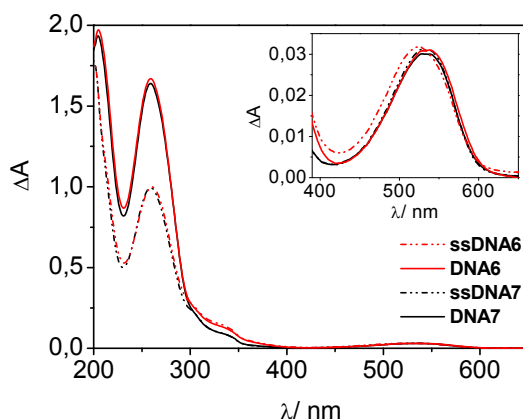


Abb. 5-30: UV/Vis-Spektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne Methylviologen als Ladungsakzeptor (**DNA19**, **DNA19a**); 5 μ M Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Die typische B-DNA Konformation wurde mittels CD-Messungen sowohl für die ethidium-, als auch für die ethidium- und methylviologenmodifizierten Duplexe bestätigt, wie die Spektren von **DNA18** und **DNA18a** in Abb. 5-31 stellvertretend für die restlichen Doppelstränge zeigen.

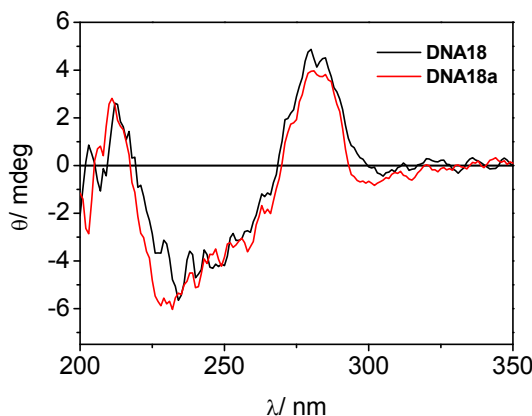


Abb. 5-31: UV/Vis-Spektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne Methylviologen als Ladungsakzeptor (**DNA19**, **DNA19a**); 5 μ M Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20 °C.

Zur Untersuchung des Ladungstrfers zwischen Ethidium und Methylviologen wurde die Fluoreszenz der Duplexe **DNA18-DNA20a** gemessen. Die Emissionsmaxima der ethidium- bzw. der ethidium- und methylviologenmodifizierten Doppelstränge liegen nach Anregung bei $\lambda = 530$ nm im Bereich zwischen $\lambda = 608$ nm und 618 nm. Abb. 5-32 zeigt die Fluoreszenz-

spektren der Einzelstränge und Duplexe in Gegenwart und Abwesenheit von Ethidium und Methylviologen.

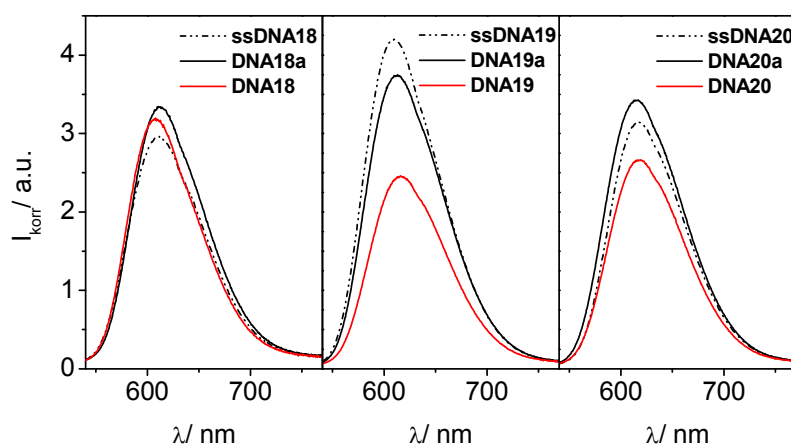


Abb. 5-32: Fluoreszenzspektren von ethidiummodifizierter DNA mit und ohne Methylviologen als Ladungsakzeptor (**DNA18-DNA20** und **DNA18a-DNA20a**), $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$; $5 \mu\text{M}$ Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl , 20°C .

Anhand der Emissionsspektren erkennt man deutlich, dass die Fluoreszenzintensität der Kontrollduplexe **DNA18a**, **DNA19a** und **DNA20a** im Rahmen der Messgenauigkeit ungefähr gleich ist und dass die Intensitäten der ethidiummodifizierten Einzelstränge in einem ähnlichen Bereich liegen. Im Gegensatz zum System Ethidium-Nitroindol korreliert hier die Fluoreszenzlöschung nicht mit dem Abstand zwischen Donor und Akzeptor. Im Falle von **DNA18**, bei der sich ein Basenpaar zwischen Ethidium und Methylviologen befindet, wird die Fluoreszenz offenbar kaum gelöscht, während man bei **DNA19** und **DNA20** eine deutliche Löschung erkennen kann. Zur Quantifizierung der Löscheffizienz wurden auch hier die F_q -Werte verwendet (vgl. Abb. 5-33; Berechnung vgl. Kapitel 5.1.2, Gleichung 5-1).

Die äußerst geringe Fluoreszenzlöschung über die Distanz von einem Basenpaar in **DNA18/DNA18a** ist zunächst einmal verwunderlich, da bisherige Untersuchungen gezeigt haben, dass die Effizienz des Ladungstransfers bei kürzeren Abständen zwischen Donor und Akzeptor am höchsten ist. Diese Diskrepanz kann nur dadurch erklärt werden, dass die elektronische Kupplung zwischen Ethidium und Methylviologen in **DNA18a** gestört ist. Dies ist wahrscheinlich auf eine ungünstige strukturelle Anordnung des Donors relativ zum Akzeptor zurück zu führen, wenn sich lediglich ein Basenpaar zwischen beiden Modifikationen befindet.

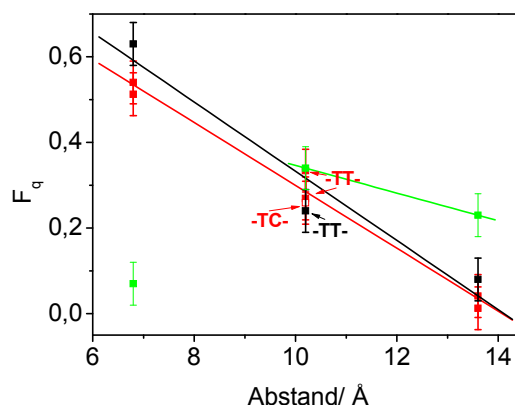


Abb. 5-33: Vergleich der Fluoreszenzlöschung in Abhängigkeit vom Abstand zwischen Ethidium und Methylviologen (grün) mit Ethidium und 5-Nitroindol (rot) und den Ergebnissen von *Valis et al.*^[30] 5 μ M Duplex in 10 mM NaPi-Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, λ_{EX} = 530 nm, 20 °C.

Die Fluoreszenzlöschung über zwei Basenpaare zwischen Ethidium und Methylviologen liegt in der gleichen Größenordnung wie im System Ethidium-Nitroindol. Der Ladungstransfer über drei Basenpaare ist bei Ethidium-Methylviologen noch deutlich effizienter als bei Ethidium-Nitroindol, was durch einen Wert von $F_q = 0,23$ gezeigt wird. Hier wirkt sich die räumliche Anordnung anscheinend positiv auf die Ladungstransfereigenschaften aus.

Im Gegensatz zum 5-Nitroindolbasensurrogat hat die zusätzliche Methylviologenmodifikation kaum Einfluss auf die Stabilität der korrekt gepaarten Duplexe. Die Schmelzpunkte der ethidium- und methylviologenmarkierten Doppelstränge liegen lediglich ca. 1-2 °C niedriger als die der Duplexe, welche nur die Ethidiummodifikation enthalten (vgl. Kapitel 7.4.6, Tabelle 7-24).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse scheint das vorgestellte Methylviologen-Derivat, das an die 2'-OH-Gruppe von Uridin „geklickt“ wurde, ein vielversprechender Akzeptor zur Untersuchung von reduktivem Ladungstransfer mittels Fluoreszenz- und transients Absorptionsmessungen zu sein. Da der Ladungstransfer von photoangeregtem Ethidium auf Methylviologen auch über eine Distanz von drei Basenpaaren noch effizient verläuft, ist der Einsatz von Methylviologen als Elektronenakzeptor in einem DETEQ-System zur Verbesserung der Reichweite und damit zur Abfrage eines ganzen Codons denkbar. Dazu müsste allerdings zuerst eine Möglichkeit gefunden werden, Methylviologen ohne Zusatz von Kupferionen an genau definierten Positionen in ethidiummodifizierte DNA (z. B. mit Hilfe einer Diels-Alder-Reaktion) einzubringen.

5.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels UV/Vis- sowie stationärer und zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen konnte bestätigt werden, dass der reduktive Elektronentransfer in Doppelsträngen, die einerseits mit Ethidium als Elektronendonator, andererseits mit 5-Nitroindol als Elektronenakzeptor kovalent modifiziert wurden, stark distanzabhängig verläuft. Die Effizienz des Ladungstransfers wird durch Anwesenheit einer natürlichen Base gegenüber von Ethidium nicht beeinflusst, wie der Vergleich mit den Ergebnissen von *Valis et al.* zeigt,^[30] die eine abasischen Stelle gegenüber von Ethidium verwendet haben um eine optimale Interkalation des sterisch anspruchsvollen Ethidium-Chromophors zu gewährleisten. Dies wurde exemplarisch anhand der Gegenbase C demonstriert. Außerdem wurde festgestellt, dass reduktiver Elektronentransfer zwischen Ethidium und 5-Nitroindol auch im Einzelstrang stattfindet, da die Fluoreszenz der ethidium- und nitroindolmodifizierten Einzelstränge im Vergleich zu den Einzelsträngen, die nur mit einer Ethidiummodifikation versehen wurden, deutlich gelöscht war.

Die Möglichkeit der Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen entsprechend des DETEQ-Konzepts wurde für die Kombination aus Ethidium als Ladungsdonor und 5-Nitroindol als Elektronenakzeptor untersucht. In Duplexen mit einem oder zwei Basenpaaren zwischen Ethidium und 5-Nitroindol konnten allerdings nur bestimmte Einzelbasenfehlpaarungen durch einen Anstieg der Fluoreszenz bzw. einer Verlängerung der Fluoreszenzlebenszeit detektiert werden, während andere Einzelbasenfehlpaarungen in Duplexen mit drei Basenpaaren zwischen Donor und Akzeptor eine Fluoreszenzlöschung und eine Verkürzung der Lebenszeit verursachten. Insgesamt waren die Intensitätsunterschiede jedoch zu gering, um eine spezifische Diskriminierung einzelner fehlgepaarter Basen zu erreichen. Die deutlich niedrigeren Schmelztemperaturen der donor- und akzeptormodifizierten Doppelstränge deuten auf eine Destabilisierung des Systems hin. Diese ist wahrscheinlich auf eine lokale strukturelle Störung der Duplexe zurück zu führen, da beide artifiziellen Basen, Ethidium und 5-Nitroindol, keine Wasserstoffbrückenbindungen mit ihren jeweiligen Gegenbasen ausbilden können.

Reduktiver Elektronentransfer durch DNA wurde anschließend in einem Ethidium-Methylviologen-System untersucht. Die kovalente Bindung des basenlabilen Methylviologens an DNA gelang postsynthetisch mit Hilfe der kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Kupplung (CuAAC). Dazu wurden zunächst Oligonukleotide mit einem alkinmodifizierten Uridinbaustein mittels Standardfestphasensynthese hergestellt und von der festen Phase abgespalten. Ein azidmodifiziertes Methylviologenderivat konnte im Anschluss daran unter regioselektiver Bildung eines 1,2,3-Triazols mit den Alkinresten der DNA verknüpft werden. Die optische

Charakterisierung der modifizierten Stränge zeigte, dass die Anwesenheit von Methylviologen lediglich eine geringe Verbreiterung der DNA-Absorptionsbande zwischen 235 nm und 250 nm sowie eine leicht erhöhte Absorption bei 230 nm verursacht. Unterschiedliche Nachbarbasen haben keinen Einfluss auf die optischen Eigenschaften von kovalent gebundenem Methylviologen. Schmelztemperaturmessungen belegen, dass die Stabilität der richtig gepaarten Duplexe auch bei Anwesenheit von Methylviologen erhalten bleibt. Eine Destabilisierung wurde nur in Doppelsträngen beobachtet, in denen sich anstelle von A eine der anderen natürlichen Basen gegenüber von Uridin befand. Titrationsexperimente der methylviologenmodifizierten Duplexe mit Ethidiumbromid zeigten, dass gebundenes Methylviologen trotz der geringeren Bewegungsfreiheit durch die kovalente Verknüpfung gut mit dem Doppelstrang wechselwirkt und somit Elektronentransfer durch DNA ermöglicht. Da Ethidium mit den Reaktionsbedingungen, die für die CuAAC benötigt werden, nicht kompatibel ist, wurden zur Untersuchung der Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers ethidiummodifizierte Einzelstränge mit methylviologenmodifizierten Einzelsträngen hybridisiert. Es zeigte sich, dass der Elektronentransfer über ein Basenpaar zwischen Ethidium und Methylviologen deutlich ineffizienter ist, als im Ethidium-Nitroindol-System, was wahrscheinlich mit der räumlichen Anordnung von Methylviologen relativ zum Ethidium zusammenhängt. Über zwei Basenpaare ist die Löschung der Fluoreszenz ähnlich stark wie bei Ethidium-Nitroindol, über drei Basenpaare ist sie deutlich stärker. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Abstand vom Donor zum Akzeptor und der Fluoreszenzlöschung, wie im System Ethidium-Nitroindol, konnte für die ethidium- und methylviologenmodifizierten Duplexe nicht gefunden werden.

6. Zusammenfassung

Im ersten Teil der Arbeit ist es gelungen die Phenanthridinium-Derivate **1-4** herzustellen, die sich durch verschiedene Substituenten an den Positionen 3, 6 und 8 von Ethidium unterscheiden. Um neue Erkenntnisse bezüglich des Einflusses dieser Substituenten auf die photo- und elektrochemischen Eigenschaften von Ethidium zu gewinnen wurden die Verbindungen **1-4** mittels UV-Vis-, Fluoreszenz- und CV-Messungen charakterisiert und mit Ethidium als Referenzsubstanz verglichen. Es zeigte sich, dass v. a. die beiden exocyclischen Aminofunktionen an Position 3 und 8 das photo- und elektrochemische Verhalten der Farbstoffe maßgeblich prägen. Die beiden Didesaminoverbindungen **1** und **2** weisen in wässriger Pufferlösung, verglichen mit **E**, deutlich blauverschobene Absorptions- und Emissionsmaxima, signifikant höhere Quantenausbeuten sowie höhere Reduktionspotentiale im angeregten Zustand auf. Die beiden Phenanthridinium-Derivate **3** und **4** verhalten sich bezüglich ihrer photo- und elektrochemischen Eigenschaften „ethidiumähnlich“, bis auf die Quantenausbeute von **4**, die in wässriger Pufferlösung deutlich stärker gelöscht wird. Für **E**, **3** und **4** konnte außerdem eine Löschung der Fluoreszenz bei steigendem pH-Wert beobachtet werden.

Spektrophotometrische und spektrofluorimetrische Titrationsexperimente zeigen, dass sich die Lage der Absorptions- und Emissionsmaxima der Verbindungen **1** und **2** bei Zugabe von DNA kaum ändert, während die Absorption von **E**, **3** und **4** bathochrom, die Fluoreszenz hypsochrom verschoben wird. Außerdem beobachtet man einen starken Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Zugabe von DNA zu den Verbindungen **E**, **3** und **4**, der, ebenso wie deren DNA-Bindungskonstanten, mit steigendem elektronenschiebendem Charakter des Substituenten in Position 6 zunimmt. Die Fluoreszenz der Didesaminoverbindungen **1** und **2** wird bei Titration mit DNA hingegen stark gelöscht, was wahrscheinlich auf einen photo-induzierten Ladungstransfer dieser Farbstoffe auf die DNA-Basen, v. a. auf die elektronenreichen Guanine, zurück zu führen ist. Die Bindungskonstanten von **1** und **2** liegen ca. eine Zehnerpotenz niedriger als die der Diaminoverbindungen.

Die Quantenausbeuten der phenylsubstituierten Phenanthridinium-Derivate **2** und **E** steigen im Vergleich zu denen der entsprechenden methylsubstituierten Verbindungen **1** und **3** bei zunehmender Viskosität des Mediums stärker an, die größte Viskositätsabhängigkeit zeigt die Emission von Verbindung **4**. Die relativ hohe Aktivierungsenergie von Verbindung **4** und die gute Übereinstimmung mit dem Torsionsmodell von *Förster* und *Hoffmann* legen nahe, dass die Rotation des 4-*N,N*-Diethylaminophenyl-Substituenten im angeregten Zustand eine wichtige Rolle bei der strahlungslosen Relaxation spielt. Quantenmechanische Berechnungen

deuten darauf hin, dass die Fluoreszenzlöschung von Verbindung **4** in polaren Lösungsmitteln durch die Ausbildung von TICT-ähnlichen Zuständen verursacht wird. Der stärkere Fluoreszenzanstieg von **E** im Vergleich zu **3** in viskosen Medien zeigt, dass auch hier eine Rotation des Phenylrings an der strahlungslosen Relaxation von **E** im angeregten Zustand beteiligt ist, allerdings scheint dieser Prozess nicht hauptausschlaggebend für die Löschung der Fluoreszenz in polaren Lösungsmitteln zu sein.

Im zweiten Teil der Arbeit konnte mittels UV-Vis- sowie stationärer und zeitaufgelöster Fluoreszenzmessungen bestätigt werden, dass der reduktive Elektronentransfer in Doppelsträngen, die sowohl mit Ethidium als Elektronendonator, als auch mit 5-Nitroindol als Elektronenakzeptor kovalent modifiziert wurden, stark distanzabhängig verläuft. Die Effizienz des reduktiven Ladungstransfers wird durch die Anwesenheit einer natürlichen Base gegenüber von Ethidium nicht beeinflusst, wie anhand der Gegenbase C gezeigt wurde. Außerdem wurde festgestellt, dass reduktiver Elektronentransfer zwischen Ethidium und 5-Nitroindol auch im Einzelstrang stattfindet.

Die Möglichkeit der Detektion von Einzelbasenfehlpaarungen entsprechend des DETEQ-Konzepts wurde für die Kombination aus Ethidium als Ladungsdonor und 5-Nitroindol als Ladungsakzeptor untersucht. Bedingt durch eine lokale strukturelle Störung der Doppelstränge, die wahrscheinlich durch fehlende Wasserstoffbrückenbindungen der artifiziellen Basen Ethidium und 5-Nitroindol mit ihren jeweiligen Gegenbasen verursacht wird, sind die Intensitätsunterschiede jedoch zu gering, um eine spezifische Diskriminierung einzelner Punktmutationen zu erreichen.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass Methylviologen, welches postsynthetisch mit Hilfe der kupfer(I)-katalysierten Azid-Alkin-Kupplung (CuAAC) kovalent an Oligonukleotide gebunden wurde, einen geeigneten Akzeptor für reduktiven Elektronentransfer in DNA darstellt. Schmelztemperaturmessungen belegten, dass die Stabilität der richtig gepaarten Duplexe auch bei Anwesenheit von Methylviologen erhalten bleibt. Da Ethidium mit den Reaktionsbedingungen, die für die CuAAC benötigt werden, nicht kompatibel ist, wurden zur Untersuchung der Distanzabhängigkeit des Ladungstransfers ethidiummodifizierte Einzelstränge mit methylviologenmodifizierten Einzelsträngen hybridisiert. Es stellte sich heraus, dass der Elektronentransfer über ein Basenpaar zwischen Ethidium und Methylviologen deutlich ineffizienter ist, als im Ethidium-Nitroindol-System, was wahrscheinlich mit der räumlichen Anordnung von Methylviologen relativ zum Ethidium zusammenhängt. Über zwei Basenpaare ist die Löschung der Fluoreszenz ähnlich stark wie bei Ethidium-Nitroindol,

über drei Basenpaare ist sie deutlich stärker. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Abstand vom Donor zum Akzeptor und der Fluoreszenzlöschung, wie im System Ethidium-Nitroindol, konnte für die ethidium- und methylviologenmodifizierten Duplexe nicht gefunden werden.

7. Experimenteller Teil

7.1. Materialien und Geräte

Reagenzien und Lösungsmittel

Die verwendeten Reagenzien wurden von den Firmen *ABCR*, *Alfa Aesar*, *Fluka*, *Merck* und *Sigma-Aldrich* bezogen. Ihre Qualität war mindestens „zur Synthese“. Technische Lösungsmittel wurden vor Gebrauch destilliert, trockene Lösungsmittel wurden von *Alfa Aesar* und *Fluka* bezogen und unter Stickstoff aufbewahrt. Zur Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie sowie für die HPLC wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*LiChrosolv*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

Reaktionsführung

Die Reaktionen wurden gegebenenfalls unter Lichtausschluss und unter Stickstoff- (Trocknung über BTS-Katalysator und Silicagel) oder Argonatmosphäre (Schweißargon 4.6, 99,996 % rein) zum Ausschluss von Luft und Feuchtigkeit durchgeführt. Die benötigten Glasgeräte wurden in diesem Fall vorher im Hochvakuum ausgeheizt.

Chromatographie

- Dünnschichtchromatographie (DC): Es wurden DC-Alufolien der Firma *Merck* mit einer Schichtdicke von 0,25 mm verwendet, die mit Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtet sind. Die Auswertung der Platten erfolgte optisch über die Fluoreszenz-Löschung bei 254 nm bzw. Fluoreszenzanregung bei 366 nm, sowie chemisch mittels verschiedener Anfärbereagenzien. Routinemäßig wurde ein MeOH/H₂SO₄-Reagenz (2 Vol.-% H₂SO₄) verwendet. Für Amine wurde ein Ninhydrin-Reagenz nach *Stahl* verwendet. Zum Erhitzen diente ein Heißluftfön.
- *Flash*-Säulenchromatographie (FC): Als stationäre Phase wurde Kieselgel 60 der Firma *Merck* mit einer Korngröße von 40- 63 µm verwendet. Es wurde nass gepackt und nach dem Verfahren von *W. C. Still* ^[446] bei ca. 0,4 bar Überdruck chromatographiert. Die Auftragung der zu reinigenden Substanz erfolgte als Lösung im Laufmittel oder gegebenenfalls auf Kieselgel aufgezogen.

NMR

Kernresonanzspektren wurden in deuterierten Lösungsmitteln an einem *Bruker Avance 300*, *Avance 400* oder *Avance 600* durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, NMR-Spektroskopie der Universität Regensburg gemessen. Die Proben befanden sich in Probenröhrchen von 5 mm Außendurchmesser und beinhalten ca. 10 mg Substanz in 0,7 mL Lösungsmittel.

Chemische Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan als Nullpunkt. Als Referenz dient das Signal des unvollständig deuterierten Lösungsmittels (^1H -NMR: 2,49 ppm für DMSO- d_5 ; 7,27 ppm für CHCl_3) bzw. das Lösungsmittelsignal (^{13}C -NMR: 39,4 ppm für DMSO- d_6 ; 77,0 ppm für CDCl_3). Kopplungskonstanten J werden in Hz angegeben.

Massenspektrometrie (MS)

Massenspektren wurden durch die Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg gemessen. Die Spektrometer werden nachfolgend kurz zusammengefasst.

- ESI-MS: *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000*
- CI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A*
- EI-MS: *Finnigan MAT SSQ 710 A*, *Finnigan MAT 95*
- FAB-MS: *Finnigan MAT 95*
- MALDI-TOF: *HP G2025 A*

Die Angabe der Peaks erfolgt in m/z mit Angabe der Intensität des Basispeaks in %.

DNA-Festphasensynthese

Die DNA-Festphasensynthese wurde an einem *Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesizer* der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Als Träger dienten CPGs mit 1 μmol Belegung (500 Å). Phosphoramidite und CPG-Säulen stammten von *ABI*, *Glen Research* und *Proligo*, Synthesizer-Chemikalien und Reagenzien von *ABI* und *Proligo*.

Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Reversed-Phase HPLC wurde mit einem *Shimadzu* HPLC-System durchgeführt (Autosampler *SIL-10AD*, Pumpenmodul *LC-10AT*, Steuereinheit *SCL-10A*, Multidiodenarray *SPD-M10A*, Fluoreszenzdetektor *RF-10A XL*). Für die Analytik unmodifizierter Oligonukleotide wurde eine *Supelcosil LC-318*-Säule (25 cm x 4,6 mm, *Supelco*) verwendet, für die präparative

Trennung eine *Supelcosil LC-318* (25 cm x 10 mm ID, 5 µm, *Supelco*). Für DNA-Stränge, die Ethidium oder Methylviologen enthielten, diente eine *Discovery® Bio Wide Pore C5* (25 cm x 4,6 mm, 5 µm, *Supelco*) als Analytiksäule, die präparative Trennung wurde auf einer *Discovery® Bio Wide Pore C5* (25 cm x 10 mm, 5 µm, *Supelco*) durchgeführt.

Die entsprechende Säule wurde mit 50 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,5; Laufmittel A) equilibriert und mit einem Acetonitril-Gradienten (Laufmittel B) durchgeführt. Die Elution erfolgte mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min (analytisch) bzw. 2,5 mL/min (präparativ). Die Detektion der DNA-Stränge erfolgte bei 260 nm und 290 nm im Fall unmodifizierter Oligonukleotide, bei 260 nm und 310 nm für methylviologenenthaltende DNA, sowie bei 260 nm und 530 nm für ethidiummodifizierte DNA (Spaltbreite 8 nm). Ethidiummarkierte DNA wurde zusätzlich über die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 530 nm detektiert. Eine Zusammenfassung der verwendeten Methoden gibt Tabelle 7-16 (Kapitel 7.4.3).

Lyophilisation

Wässrige Lösungen wurden an einer *Christ Alpha 1-2 LD* Lyophilisierungsanlage nach Ausfrieren in flüssigem Stickstoff gefriergetrocknet.

Optische Spektroskopie

Alle spektroskopischen Methoden wurden, soweit nicht anders angegeben, in Quarzglasküvetten (1 cm) bei 20 °C durchgeführt. Zur Messung wurden hochgereinigte organische Lösungsmittel (*Uvasol®*, *Merck*) sowie entionisiertes Wasser aus einer *Millipore*-Entsalzungsanlage verwendet.

- Absorption

UV/Vis-Spektren wurden an einem *Varian Cary 100 Bio* mit temperierbarem Küvettenhalter 6 x 6 aufgenommen und sind gegen das Lösungsmittelsignal korrigiert. Einstellungen: SBW 1,0 nm, Average time 2 s, Light source changeover: 350 nm. Schmelzpunktmessungen wurden im Programm „Thermal“ mit den identischen Einstellungen durchgeführt. Die Heiz- bzw. Kühlrate betrug 0,7 °C/min.

- Fluoreszenz

Die Aufnahme von Fluoreszenzspektren erfolgte an einem *Fluoromax-3 Fluorimeter* (*Jobin-Yvon*) mit Peltier-Element zur Temperaturregulation (*LFI-3751*). Folgende Software-Einstellungen wurden verwendet: Integration time 0,2 s, Increment 0,5 nm.

Die Spektren wurden gegen die Ramanstreuung des Lösungsmittels basislinienkorrigiert.

- Zirculardichroismus (CD)

CD-Messungen wurden an einem *Jasco J-715 Spektropolarimeter* mit *PTC-150J* Thermostat durchgeführt. Die Basislinienkorrektur erfolgte gegen das Lösungsmittel. Folgende Messparameter wurden verwendet: Sensitivity: 100 mdeg, Data Pitch: 1 nm, Scanning Mode: continous, Scanning Speed: 200 nm/min, Response: 1 s, Band Width: 1 nm, Accumulation: 5

- Spektroelektrochemie, Radikalspektroskopie (SEC)

Für die SEC-Messungen wurde eine spezielle Zelle aus Calciumfluorid-Platten mit einer Drei-Elektroden-Anordnung verwendet. Als Arbeitselektrode diente ein Platinnetz. Die entsprechende Gegen- bzw. Referenzelektrode bestand aus Platin bzw. Silber. Die Messungen wurden in einem *Varian Cary 50* mit speziellem Probenhalter in trockenen Lösungsmitteln und mit NBu_4PF_6 als Leitsalz durchgeführt. Es wurden die Absorptionsänderungen bei sinkendem Potential aufgezeichnet. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten (*Cubepot*) erzeugt, der mit der Software *Mastercontrol* angesteuert werden konnte. Die Potentiale wurden nicht gegen einen internen Standard kalibriert und sind daher keine Absolutwerte.

- Fluoreszenzlebenszeiten

Fluoreszenzlebenszeiten wurden an einem *ISS K2 Fluorometer* gemessen. Die Bestimmung erfolgte über die Phasenmodulationsmethode. Diese Methode verwendet zur Anregung der Fluorophore eine kontinuierlich strahlende Lichtquelle ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) mit sinusförmig moduliertem Licht. Aus Phasenunterschied und Amplitudenveränderung kann die Lebenszeit bestimmt werden.

Cyclovoltammetrie (CV)

CV-Messungen wurden mit einer Drei-Elektroden-Anordnung aus Gegenelektrode, Pseudo-Referenzelektrode und Arbeitselektrode durchgeführt. Die Elektroden bestanden aus Platin. Das Potential wurde durch einen Potentiostaten (*Cubepot*) erzeugt, der mit der Software *Mastercontrol* angesteuert wurde. Vor der Messung wurde die Zelle mit Argon gespült. Messungen wurden in trockenem MeCN und mit NBu_4PF_6 als Leitsalz ($c = 50 \text{ mM}$) durchgeführt. Als Referenzstandard wurde Ferrocen, dessen Potential $E(\text{Fc}/\text{Fc}^{*+})$ bekannt ist, verwendet. Die Spektren wurden mit einer Vorschubgeschwindigkeit von 200 mV/s

aufgenommen. Die erhaltenen Potentiale können mit einem Umrechnungsfaktor von + 0,63 V auf Potentiale gegen die Normalwasserstoffelektrode (NHE) umgerechnet werden.^[447]

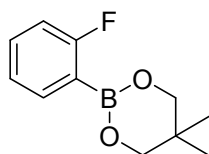
Kristallstrukturuntersuchung

Die Röntgenstrukturanalyse der Verbindungen **1** und **4** wurde von der kristallographischen Abteilung der Universität Regensburg angefertigt. Die Messungen wurden an einem *OXFORD Diffraction Gemini R Ultra CCD*-Diffraktometer bei einer Temperatur von $T = 123\text{ K}$ durchgeführt. Als Strahlungsquelle diente eine Röntgenröhre mit Cu-Anode und nachgeschaltetem Graphit-Monochromator ($\text{Cu-K}_{\alpha} = 1,54184\text{ \AA}$).

7.2. Synthesen

7.2.1. Darstellung von 5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (1)

7.2.1.1. Synthese von 2-(2-Fluorphenyl)-5,5-dimethyl-[1,3,2]dioxaborinan (7) ^[369]



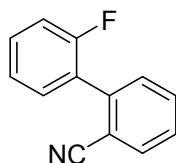
C₁₁H₁₄BF₂O₂
MW: 208,04 g/mol

Eine Lösung aus 6,54 mL (38,8 mmol) 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin in 40 mL absolutem THF wird unter Stickstoffatmosphäre auf -10 °C gekühlt, mit 23,4 mL (37,5 mmol, 1,6 M) n-Butyllithium versetzt und 10 min. bei -10 °C gerührt. Nachdem die Lösung auf -78 °C gekühlt wurde, werden 11,5 mL (50 mmol) Triisopropylborat zugegeben und 5 min. bei -78 °C gerührt. Anschließend werden 2,35 mL (25 mmol) Fluorbenzol (**5**) tropfenweise über eine Spritze hinzugefügt. Nach 2 h Rühren bei -78 °C lässt man die Lösung langsam (über 3- 4 h) auf RT aufwärmen. Nach Zugabe von 100 mL gesättigter NH₄Cl- Lösung wird dreimal mit je 100 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird in 100 mL Toluol gelöst, mit 3,13 g (30 mmol) 2,2-dimethyl-1,3-propandiol versetzt und über Nacht bei RT gerührt. Die Toluol-Phase wird dreimal mit je 50 mL Wasser gewaschen, die vereinigten wässrigen Phasen anschließend dreimal mit je 50 mL CH₂Cl₂. Die vereinigten CH₂Cl₂-Phasen werden mit 50 mL Wasser gewaschen und mit der Toluol-Phase vereinigt. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es werden 5,10 g (98 % d. Th.) eines orangefarbenen Öls erhalten.

DC (Heptan/EtOAc 3:1) R_f= 0,63.

EI-MS m/z (%): 208,1 (100) [M⁺].

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[369, 373] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.1.2. Synthese von 2-(2-Fluorphenyl)benzonitril (9) ^[373]

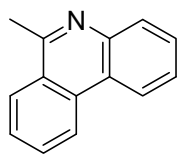
C₁₃H₈FN
MW: 197,21 g/mol

5,20 g (25,0 mmol) 2-(2-Fluorphenyl)-5,5-dimethyl-[1,3,2]dioxaborinan (7) und 4,91 g (27,0 mmol) 2-Bromobenzonitril (8) werden unter Stickstoffatmosphäre in 25 mL EtOH und 150 mL Toluol gelöst. Anschließend werden 25 mL einer wässrigen K₂CO₃-Lösung (50 mmol, 2 M) und 0,85 g (0,75 mmol) Pd(PPh₃)₄ zugegeben. Die Reaktionsmischung wird auf 85 °C erhitzt und 7 h bei 85 °C gerührt. Nach Abkühlen auf RT wird das Reaktionsgemisch mit 100 mL Wasser versetzt und dreimal mit je 100 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird anschließend über Kieselgel filtriert (Eluent: Heptan/EtOAc 3:1) und aus 80 mL Heptan umkristallisiert. Es werden 2,17 g weiße Kristalle erhalten. Die Mutterlauge wird komplett eingedampft und über FC (Heptan/EtOAc 10:1) gereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man 2,24 g weiße Kristalle, zusammen werden 4,41 g (89 %) 2-(2-Fluorphenyl)benzonitril erhalten.

DC (Heptan/EtOAc 3:1) R_f = 0,52.

EI-MS m/z (%): 197,2 (100) [M⁺].

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[373] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.1.3. Synthese von 6-Methyl-phenanthridin (10) ^[373]

C₁₄H₁₁N
MW: 193,24 g/mol

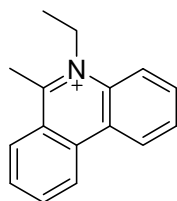
28 mL absolutes THF wird unter Stickstoffatmosphäre auf -78 °C gekühlt und mit 4,6 mL (7,4 mmol, 1,6 M in Et₂O) Methyllithium versetzt. Eine Lösung aus 1,38 g (7,0 mmol) 2-(2-Fluorphenyl)benzonitril (**9**) in 7 mL absolutem THF wird unter Rühren zugetropft. Zunächst wird der Ansatz 15 min. bei -78 °C, dann weitere 20 min. bei RT gerührt. Durch Zugabe von 70 mL gesättigter NH₄Cl-Lösung wird die Reaktion abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wird dreimal mit je 140 mL CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über FC (Heptan/EtOAc/Toluol 4:1:6) gereinigt. Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Trocknen am HV werden 1,11 g (82 % d. Th.) eines hellgelben Feststoffs erhalten.

DC (Heptan/EtOAc 3:1) *R_f* = 0,23.

EI-MS *m/z* (%): 193,2 (100) [*M*⁺].

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[373] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.1.4. Synthese von 5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (1)



C₁₆H₁₆N⁺
MW: 222,30 g/mol

C₁₆H₁₆IN
MW: 349,21 g/mol

0,40 g (2,1 mmol) 6-Methyl-phenanthridin (**10**) werden in 6,7 mL (83,8 mmol) Iodethan unter Stickstoffatmosphäre gelöst und 8 d unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird isoliert, gründlich mit Et₂O gewaschen und am HV getrocknet. Zur Reinigung wird das Rohprodukt aus einer MeCN-Et₂O-Mischung umkristallisiert, mit Et₂O gewaschen und am HV getrocknet. Es werden 0,42 g (58 % d. Th.) gelbe, nadelförmige Kristalle erhalten.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,64 (t, 3 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 3,47 (s, 3 H, CH₃), 5,13 (q, 2 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 8,03- 8,14 (m, 3 H, H₂, H₈, H₃), 8,34 (td, 1 H, H₉, ³*J* = 8 Hz, ³*J* = 1 Hz), 8,64 (d, 1 H, H₄, ³*J* = 8 Hz), 8,92 (d, 1 H, H₇, ³*J* = 8 Hz), 9,12- 9,18 (m, 2 H, H₁₀, H₁).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 13,4 (CH₂-CH₃), 19,1 (CH₃), 48,5 (CH₂-CH₃), 120,0 (C₄), 123,3 (C₁₀), 124,6 (C_{6a}), 124,6 (C₁), 124,8 (C_{10b}), 129,6 (C₂), 130,2 (C₈), 130,6 (C₇), 131,9 (C₃), 133,1 (C_{10a}), 133,6 (C_{4a}), 136,8 (C₉), 165,2 (C₆).

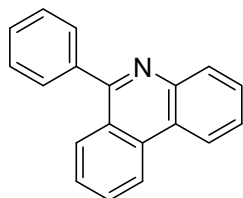
2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

EI-MS *m/z* (%): 222,2 (100) [*M*⁺].

EA berechnet für C₁₆H₁₆IN (349,21): C 55,03; H 4,62; N 4,01. gefunden: C 54,98; H 4,65; N 4,01.

7.2.2. Darstellung von 5-Ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumiodid (2)

7.2.2.1. Synthese von 6-Phenyl-phenanthridin (11) ^[373]



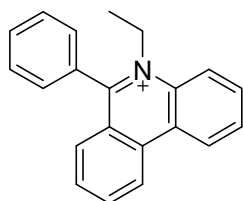
C₁₉H₁₃N
MW: 255,31 g/mol

28 mL absolutes THF wird unter Stickstoffatmosphäre auf -78 °C gekühlt und mit 4,1 mL (7,4 mmol, 1,8 M in Di-*n*-butylether) Phenyllithium versetzt. Eine Lösung aus 1,38 g (7,0 mmol) 2-(2-Fluorphenyl)benzonitril (9) in 7 mL absolutem THF wird unter Rühren zugetropft. Zunächst wird der Ansatz 15 min. bei -78 °C, dann weitere 20 min. bei RT gerührt. Durch Zugabe von 70 mL gesättigter NH₄Cl-Lösung wird die Reaktion abgebrochen. Das Reaktionsgemisch wird dreimal mit je 140 mL CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen werden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über FC (Heptan/EtOAc/Toluol 10:1:10) gereinigt. Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Trocknen am HV werden 1,52 g (85 % d. Th.) eines gelben Feststoffs erhalten.

DC (Heptan/EtOAc/Toluol 10:1:10) $R_f = 0,24$.

EI-MS m/z (%): 255,2 (49) [M⁺], 254,1 (100) [M⁺-H⁺].

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[373] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.2.2. Synthese von 5-Ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumiodid (2)

$\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}^+$
MW: 284,37 g/mol
 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{IN}$
MW: 411,28 g/mol

0,40 g (1,57 mmol) 6-Phenyl-phenanthridin (**11**) werden in 2,2 mL (27,5 mmol) Iodethan unter Stickstoffatmosphäre gelöst und 8 d unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird isoliert, gründlich mit Et_2O gewaschen und am HV getrocknet. Zur Reinigung wird das Rohprodukt aus MeCN/ Et_2O umkristallisiert, mit Et_2O gewaschen und am HV getrocknet. Es werden 0,41 g (63 % d. Th.) gelbe, plättchenförmige Kristalle erhalten.

^1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,49 (t, 3 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, $^3J = 7$ Hz), 4,83 (q, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$, $^3J = 7$ Hz), 7,52 (d, 1 H, H7, $^3J = 8$ Hz), 7,80-7,83 (m, 5 H, Ph-H), 7,94 (t, 1 H, H8, $^3J = 8$ Hz), 8,17- 8,22 (m, 2 H, H2, H3), 8,37 (t, 1 H, H9, $^3J = 8$ Hz), 8,73 (dd, 1 H, H4, $^3J = 8$ Hz, $^4J = 2$ Hz), 9,26 (d, 1 H, H10, $^3J = 8$ Hz), 9,31 (dd, 1 H, H1, $^3J = 8$ Hz, $^3J = 2$ Hz)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 14,5 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 50,2 ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 120,8 (C4), 123,1 (C10), 124,9 (C1), 125,6 (C6a), 126,0 (C10b), 128,2 (C-Ph), 129,2 (C-Ph), 130,2 (C8), 130,3 (C2), 131,1 (C-Ph), 131,3 (C-Ph), 132,3 (C3), 132,4 (C7), 133,4 (C4a), 134,4 (C10a), 137,2 (C9), 163,9 (C6).

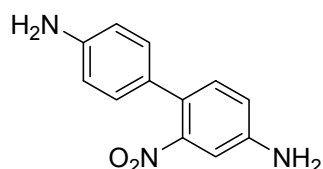
2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

EI-MS m/z (%): 284,1 (100) [M^+].

EA berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{IN}$ (411,28): C 61,33; H 4,41; N 3,41. gefunden: C 61,17; H 4,46; N 3,39.

7.2.3. Darstellung von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-methyl-phenanthridinium-trifluoracetat (3)

7.2.3.1. Synthese von 2-Nitrobenzidin (13) ^[370]



C₁₂H₁₁N₃O₂
MW: 229,23 g/mol

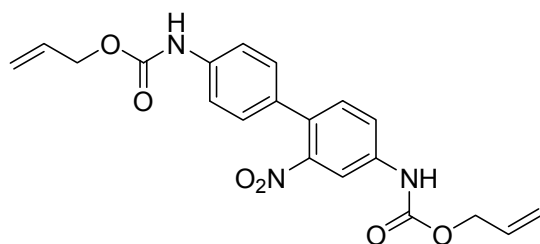
4 g (21,7 mmol) Benzidin (**12**) werden in unter Rühren in 38 mL konz. H₂SO₄ gelöst (ggf. wird auf 50 °C erwärmt). Nach Abkühlen auf ca. 10- 15 °C werden innerhalb von 30 min. 2,2 g (21,7 mmol) KNO₃ zugegeben. Die Reaktionsmischung wird 1 h bei RT gerührt und anschließend unter Eiskühlung durch Zugabe von 65 mL Wasser hydrolysiert. Die Suspension wird erhitzt bis eine klare Lösung entsteht und anschließend abgeschreckt. Der ausgefallene beigefarbene Feststoff wird isoliert und erneut in Wasser suspendiert. Die Suspension wird mit ca. 13 mL NH₄OH (28 %) neutralisiert, der entstehende rote Niederschlag isoliert und gründlich mit Wasser gewaschen. Zur Reinigung wird das Rohprodukt aus einer EtOH-Wasser-Mischung umkristallisiert und am HV getrocknet. Es werden 3,95 g (79 % d. Th.) dunkelrote Kristalle erhalten.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 100:5) *R_f* = 0,60.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 5,16 (s, 2 H, NH₂), 5,67 (s, 2 H, NH₂), 6,54 (dt, 2 H, H3', H5' ³*J* = 7 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 6,81 (dd, 1 H, H5, ³*J* = 8 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 6,85 (dt, 2 H, H2', H6' ³*J* = 7 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 6,91 (d, 1 H, H3, ³*J* = 2 Hz), 7,08 (d, 1 H, H6, ³*J* = 8 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 107,4, 113,8, 117,3, 122,2, 124,4, 128,1, 131,7, 147,8, 148,0, 149,5.

EI-MS *m/z* (%): 229,0 (100) [M⁺⁺].

7.2.3.2. Synthese von 4,4'-Bis-allyloxycarbonylamino-2-nitrobiphenyl (14).

C₂₀H₁₉N₃O₆
MW: 397,38 g/mol

3,27 g (14,3 mmol) 2-Nitrobenzidin (**13**) werden unter Stickstoffatmosphäre in 100 mL absolutem CH₂Cl₂ suspendiert und langsam mit 17,5 mL (0,33 mol) Chlorameisensäureallylester versetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wird die Reaktionsmischung auf 1/10 des Volumens eingengt und mit 70 mL (6 N) NH₄OH versetzt, wobei ein brauner Niederschlag ausfällt, der isoliert und mit Wasser gewaschen wird. Nach Trocknen am HV erhält man 5,35 g (95 % d. Th.) eines hellbraunen Feststoffs. Eine analysenreine Probe wird durch Umkristallisieren aus einer Heptan-EtOAc-Mischung erhalten.

DC (Heptane/EtOAc 5:4) *R_f* = 0,48.

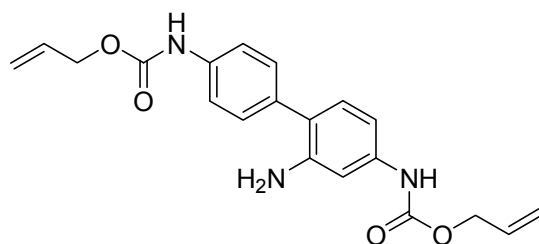
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 4,61- 4,67 (m, 4H, CH₂O), 5,22- 5,28 (m, 2H, CH₂=CH), 5,34- 5,36 (m, 1H, CH₂=CH), 5,39- 5,42 (m, 1H, CH₂=CH), 5,93- 6,07 (m, 2H, CH₂=CH), 7,22 (d, 2 H, H2', H6', ³*J* = 9 Hz), 7,47 (d, 1 H, H6, ³*J* = 9 Hz), 7,52 (d, 2 H, H3', H5', ³*J* = 9 Hz), 7,71 (dd, 1 H, H5, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 8,10 (d, 1 H, H3, ³*J* = 2 Hz), 9,88 (s, 1H, NH), 10,28 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 64,6 (OCH₂), 65,0 (OCH₂), 112,7, 117,5, 117,9, 118,2, 121,7, 128,2, 128,4, 130,5, 132,2, 132,8, 133,1, 138,8, 139,0, 148,7, 153,1 (2 COOCH₂).

EI-MS *m/z* (%): 398,1 (100) [M-H⁺], 432.2 (10) [M+Cl⁻].

EA berechnet für C₂₀H₁₉N₃O₆ (397,38): C 60,45; H 4,82; N 10,57. gefunden: C 60,50; H 4,85; N 10,55.

7.2.3.3. Synthese von 4,4'-Bis-allyloxycarbonylamino-2-biphenylamin (15)



C₂₀H₂₁N₃O₄
MW: 367,40 g/mol

Zu einer Suspension aus 5,21 g (13,1 mmol) **14** und 4,91 g (87,9 mmol) Eisenpulver in 260 mL Wasser wird konz. HCl zugetropft bis ein pH-Wert von 1- 2 erreicht ist. Die Reaktionsmischung wird 1 h unter Rückfluss erhitzt, anschließend mit 300 mL EtOH versetzt und weitere 30 min unter Rückfluss gerührt. Nicht umgesetztes Eisenpulver wird durch Heißfiltration entfernt. Nach Einengen der Reaktionslösung bildet sich ein hellbrauner Niederschlag, der isoliert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet wird. Man erhält 3,79 g (79 % d. Th.) des gelb-braunen Feststoffs.

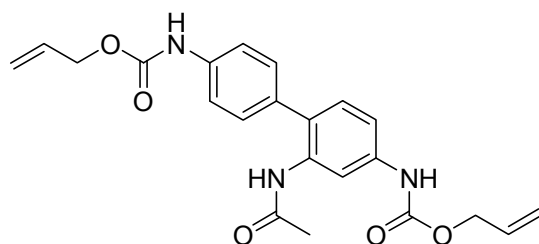
DC (CH₂Cl₂/Aceton 20:1) *R_f* = 0,27

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 4,57- 4,63 (m, 4H, CH₂O), 4,76 (s, 2 H, NH₂), 5,21- 5,23 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,25- 5,27 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,32- 5,35 (m, 1H, CH₂=CH), 5,38- 5,41 (m, 1H, CH₂=CH), 5,92-6,06 (m, 2H, CH₂=CH), 6,70 (dd, 1 H, H5, ³*J* = 8 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 6,86 (d, 1 H, H6, ³*J* = 8 Hz), 6,93 (d, 1 H, H3, ³*J* = 2 Hz), 7,29 (d, 2 H, H2', H6', ³*J* = 9 Hz), 7,50 (d, 2 H, H3', H5', ³*J* = 9 Hz), 9,51 (s, 1H, NH), 9,78 (s, 1H, NH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 64,3 (OCH₂), 64,5 (OCH₂), 104,7, 107,4, 109,5, 117,3, 117,4, 118,3, 120,3, 124,4, 127,1, 128,8, 130,0, 133,2, 133,3, 137,4, 138,7, 145,1, 153,0 (COOCH₂), 153,1 (COOCH₂).

CI-MS *m/z* (%): 252,0 (20) [M+H⁺-2C₃H₆O]⁺, 284,1 (22) [M+H⁺-C₄H₆O₂]⁺, 310,0 (99) [M+H⁺-C₃H₆O]⁺, 327,2 (34) [M+NH₄⁺-C₃H₆O]⁺, 368,1 (100) [M+H⁺]⁺, 385,2 (8) [M+NH₄⁺]⁺.

EA berechnet für C₂₀H₂₁N₃O₄ (367,40): C 65,38; H 5,76; N 11,44. gefunden: C 64,98; H 5,88; N 10,96.

7.2.3.4. Synthese von 2-Acetylamino-4,4'-bis-allyloxycarbonylamino-biphenyl (16)

C₂₂H₂₃N₃O₅
MW: 409,44 g/mol

1,20 g (3,27 mmol) **15** werden in 24 mL absolutem CH₂Cl₂ unter Stickstoffatmosphäre gelöst und mit 3,5 mL (49 mmol) Acetylchlorid versetzt. Nach 48 h Rühren bei RT wird der rosafarbene Niederschlag isoliert, mit wenig CH₂Cl₂ gewaschen und am HV getrocknet. Das Rohprodukt wird aus ca. 40 mL Chlorbenzol umkristallisiert, gründlich mit Petrolether gewaschen und am HV getrocknet. Es werden 0,97 g (73 % d. Th.) eines beigefarbenen Feststoffs erhalten.

DC (CH₂Cl₂/Aceton 3:1) *R_f* = 0,73.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,89 (s, 3 H, CH₃), 4,61- 4,63 (m, 4H, CH₂O), 5,23- 5,26 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,33- 5,35 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,39- 5,41 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,93-6,06 (m, 2H, CH₂=CH), 7,21 (d, 1 H, H₆, ³*J* = 8 Hz), 7,26 (d, 2 H, H₂', H₆', ³*J* = 8 Hz), 7,38 (d, 1 H, H₅, ³*J* = 8 Hz), 7,50 (d, 2 H, H₃', H₅', ³*J* = 8 Hz), 7,58 (s, 1 H, H₃), 9,21 (s, 1H, NH), 9,80-9,82 (m, 2H, NH).

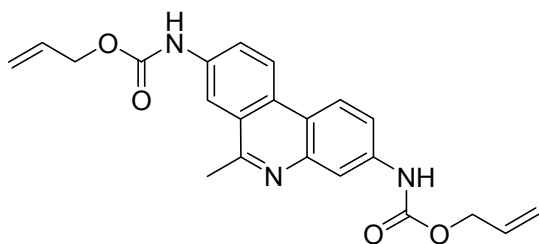
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 22,9 (CH₃) 64,6 (2 OCH₂), 115,8 (C₅), 116,8 (C₃), 117,5 (2 CH₂=CH), 117,9 (C₃', C₅'), 128,9 (C₂', C₆'), 130,1 (C₆), 130,4 (C₁), 132,8 (C₁'), 133,2 (CH₂=CH), 133,2 (CH₂=CH), 134,9 (C₂), 137,8 (C₄'), 138,2 (C₄), 153,0 (COOCH₂), 153,1 (COOCH₂), 168,5 (COCH₃).

2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

CI-MS *m/z* (%): 240,1 (19) [M-H⁺-2C₄H₆O₂]⁺, 266,1 (47) [M-H⁺- C₄H₆O₂-C₃H₆O]⁺, 292,1 (19) [M-H⁺-2C₃H₆O]⁺, 324,2 (62) [M-H⁺-C₄H₆O₂]⁺, 350,2 (52) [M-H⁺-C₃H₆O]⁺, 408,2 (100) [M-H⁺]⁺.

EA berechnet für C₂₂H₂₃N₃O₅ (409,44): C 64,54; H 5,66; N 10,26. gefunden: C 64,04; H 5,70; N 10,17.

7.2.3.5. Synthese von 3,8-Diallyloxycarbonylamino-6-methyl-phenanthridin (17)



C₂₂H₂₁N₃O₄
MW: 391,42 g/mol

7,16 g (1,75 mmol) **16** werden unter Stickstoffatmosphäre in 8,2 mL (87,4 mmol) POCl₃ 3 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird überschüssiges POCl₃ durch Abdestillieren entfernt und der Rückstand in Ethanol aufgenommen. Die Lösung wird durch Zutropfen von konz. NH₄OH neutralisiert und mehrmals mit Et₂O extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mehrmals mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Man erhält 582 mg (85 % d. Th.) eines hellgelben Feststoffs. Eine analysenreine Probe wird durch Umkristallisieren aus Et₂O erhalten.

DC (CH₂Cl₂/Aceton 3:1) *R_f* = 0,45.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 2,87 (s, 3 H, CH₃), 4,67- 4,69 (m, 4H, CH₂O), 5,25- 5,29 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,37- 5,38 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,43- 5,44 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,98-6,08 (m, 2H, CH₂=CH), 7,73 (d, 1 H, H2, ³*J* = 9 Hz), 7,92 (d, 1 H, H9, ³*J* = 9 Hz), 8,12 (s, 1 H, H4), 8,43 (s, 1 H, H7), 8,55 (d, 1 H, H1, ³*J* = 9 Hz), 8,65 (d, 1 H, H10, ³*J* = 9 Hz), 10,07 (s, 1H, NH), 10,16 (s, 1H, NH).

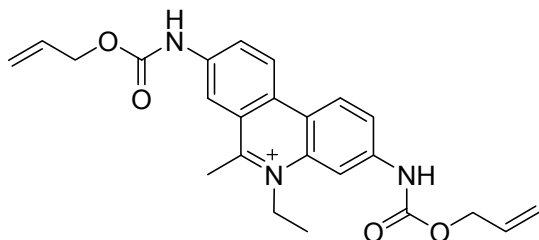
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 22,9 (CH₃) 64,7 (2 OCH₂), 113,3 (C7), 115,9 (C4), 117,6 (2 CH₂=CH), 118,0 (C10b), 118,4 (C2), 122,4 (C9), 122,6 (C1), 123,0 (C10), 125,1 (C6a), 127,2 (C10a), 133,1 (CH₂=CH), 133,2 (CH₂=CH), 137,8 (C8), 138,8 (C3), 143,1 (C4a), 153,1 (COOCH₂), 153,2 (COOCH₂), 158,3 (C6).

2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

ESI-MS *m/z* (%): 392,0 (100) [M+H⁺]⁺, 783,2 (15) [2M+H⁺]⁺.

EA berechnet für C₂₂H₂₁N₃O₄ (391,42): C 67,51; H 5,44; N 10,74. gefunden: C 67,06; H 5,55; N 10,53.

7.2.3.6. Synthese von 3,8-Diallyloxycarbonylamino-5-ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (18).



$\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_4^+$
MW: 420,48 g/mol
 $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{IN}_3\text{O}_4$
MW: 547,39 g/mol

530 mg (1,35 mmol) **17** werden in 18 mL Nitromethan (getrocknet über Molsieb) unter Stickstoffatmosphäre gelöst, mit 2,3 mL (28,8 mmol) Iodethan versetzt und 7 d unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird isoliert, gründlich mit kaltem Nitromethan und Et₂O gewaschen und am HV getrocknet. Es werden 447 mg (68 % d. Th.) eines gelben Feststoffs erhalten.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 100:8) *R_f* = 0,19.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,67 (t, 3 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 3,34 (s, 3 H, CH₃), 4,71-4,74 (m, 4 H, CH₂O), 4,96 (q, 2 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 5,28-5,30 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,30-5,32 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,40- 5,42 (m, 1 H, CH₂=CH), 5,43- 5,45 (m, 1 H, CH₂=CH), 6,01-6,07 (m, 2H, CH₂=CH), 7,99 (dd, 1 H, H2, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 8,24 (dd, 1 H, H9, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 8,68 (d, 1 H, H4, ³*J* = 2 Hz), 8,84 (d, 1H, H7, ³*J* = 2 Hz), 8,93 (d, 1 H, H10, ³*J* = 9 Hz), 8,94 (d, 1 H, H1, ³*J* = 9 Hz), 10,49 (s, 1 H, NH), 10,56 (s, 1 H, NH).

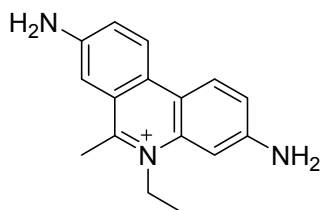
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 12,9 (CH₂-CH₃), 18,9 (CH₃), 48,7 (CH₂-CH₃), 65,3 (OCH₂), 65,3 (OCH₂), 106,2 (C4), 115,3 (C7), 118,1 (CH₂=CH), 118,1 (CH₂=CH), 119,9 (C10b), 120,7 (C2), 123,9 (C10), 124,5 (C6a), 125,1 (C1), 128,2 (C9), 128,7 (C10a), 132,8 (CH₂=CH), 132,9 (CH₂=CH), 134,0 (C4a), 139,9 (C8), 141,7 (C3), 153,3 (COOCH₂), 153,3 (COOCH₂), 163,9 (C6).

2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

ESI-MS *m/z* (%): 420,0 (100) [M]⁺.

EA berechnet für C₂₄H₂₆IN₃O₄·0,5 H₂O (556,40): C 51,81; H 4,89; N 7,55. gefunden: C 51,84; H 4,60; N 7,51.

7.2.3.7. Synthese von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-methyl-phenanthridiniumtrifluoracetat (3).



C₁₆H₁₈N₃⁺
 MW: 252,33 g/mol
C₁₈H₁₈F₃N₃O₂
 MW: 365,35 g/mol

Zu einer Lösung aus 305 mg (0,56 mmol) **18** in 22 mL abs. CH₂Cl₂ und 0,06 mL Wasser werden unter Stickstoffatmosphäre nacheinander 13,9 mg (0,01 mmol) Pd(PPh₃)₄, 31,7 mg (0,12 mmol) PPh₃ und 0,47 mL (1,78 mmol) Bu₃SnH zugegeben. Nach 90 min. Rühren bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von 12 mL Wasser abgebrochen. Die Reaktionslösung wird anschließend zur Trockene eingedampft und das Rohprodukt gründlich mit Dioxan und Et₂O gewaschen. Das Rohprodukt wird mittels HPLC auf einer präparativen RP-C18 Säule (A= H₂O (0,0059 % TFA), B= MeCN; Gradient= 10-34% B über 18 min, 34-95% B über 17 min) gereinigt. Man erhält 148 mg (73 % d. Th.) eines dunkelroten Feststoffs.

DC (EtOAc/ MeOH/ H₂O 2:1:1) *R_f*= 0,26.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,58 (t, 3 H, CH₂-CH₃, ³*J*= 7 Hz), 3,15 (s, 3 H, CH₃), 4,79 (q, 2 H, CH₂-CH₃, ³*J*= 7 Hz), 5,98 (br s, 2 H, NH₂), 6,23 (br s, 2 H, NH₂), 7,20 (dd, 1H, H2, ³*J*= 9 Hz, ⁴*J*= 1 Hz), 7,35 (d, 1 H, H4, ³*J*= 1 Hz), 7,45 (d, 1 H, H7, ³*J*= 2 Hz), 7,48 (dd, 1H, H9, ³*J*= 9 Hz, ⁴*J*= 2 Hz), 8,45 (d, 1 H, H10, ³*J*= 6 Hz), 8,48 (d, 1 H, H1, ³*J*= 6 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 13,0 (CH₂-CH₃), 18,1 (CH₃), 47,6 (CH₂-CH₃), 98,3 (C4), 106,6 (C7), 116,1 (C10b), 118,8 (C2), 122,8 (C10), 123,8 (C6a), 124,3 (C1), 125,8 (C10a), 127,0 (C9), 134,3 (C4a), 148,1 (C8), 150,6 (C3), 159,1(C6).

2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

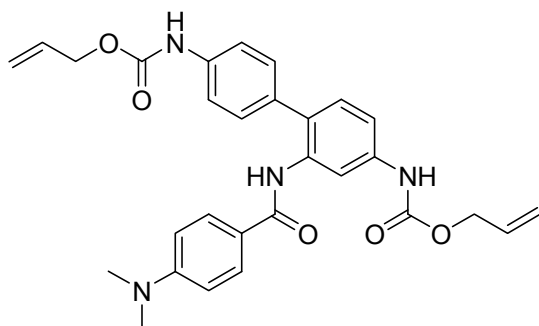
ESI-MS *m/z* (%):252,0 (100) [M]⁺.

HR-LSI-MS *m/z* (M⁺) berechnet für C₁₆H₁₈N₃⁺: 252,1501; gefunden: 252,1501.

EA berechnet für C₁₈H₁₈F₃N₃O₂ (365,35): C 59,17; H 4,97; N 11,50; gefunden: C 58,93; H 5,27; N 11,40.

7.2.4. Darstellung von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4-*N,N*-diethylamino)-phenyl-phenanthridiniumtrifluoracetat (4)

7.2.4.1. Synthese von 2-(4-*N,N*-Dimethylamino)-phenylamido-4,4'-bis-allyloxycarbonylamino-biphenyl (20).



C₂₉H₃₀N₄O₅
MW: 514,57 g/mol

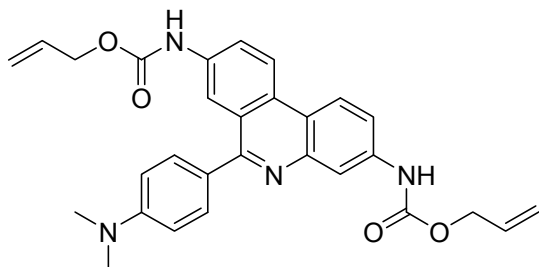
Zu einer Lösung aus 1,54 g (4,2 mmol) **15** in 90 mL abs. CH₂Cl₂ werden unter Stickstoffatmosphäre 1,50 g (8,4 mmol) 4-*N,N*-Dimethylaminobenzoylchlorid (**19**) und 0,72 mL (4,2 mmol) DIPEA gegeben. Die klare Lösung wird 3 d bei RT gerührt, wobei nach einiger Zeit eine graue Suspension entsteht. Die Reaktion wird durch Zugabe von ca. 100 mL Wasser abgebrochen und anschließend ausgeschüttelt. Die organische Phase wird mit gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknen am HV erhält man 2,03 g (95 % d. Th.) eines hellbeigen Feststoffs.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 100:5) *R_f* = 0,64.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 2,98 (s, 6 H, CH₃), 4,58-4,63 (m, 4 H, CH₂O), 5,20-5,27 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,32-5,41 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,92-6,06 (m, 2H, CH₂=CH), 6,68 (d, 2 H, H3'', H5'', ³*J* = 9 Hz), 7,26 (d, 1 H, H6, ³*J* = 9 Hz), 7,32 (d, 2 H, H2', H6', ³*J* = 9 Hz), 7,41-7,44 (m, 3 H, H5, H3', H5'), 7,63-7,69 (m, 3 H, H3, H2'', H6''), 9,75 (s, 1 H, NH), 9,85 (s, 1 H, NH), 9,92(s, 1 H, NH).

ESI-MS *m/z* (%): 515,3 (100) [M+H⁺]⁺, 1029,5 (7) [2M+H⁺]⁺.

7.2.4.2. Synthese von 3,8-Diallyloxycarbonylamino-6-(4-*N,N*-dimethylamino)-phenyl-phenanthridin (**21**).



C₂₉H₂₈N₄O₄
MW: 496,56 g/mol

1,05 g (2,04 mmol) **20** werden unter Stickstoffatmosphäre in 21 mL (0,23 mmol) POCl₃ 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und überschüssiges POCl₃ durch langsame Zugabe von Wasser vernichtet. Die Lösung wird durch Zutropfen von konz. NH₄OH auf pH 8-9 eingestellt, der entstehende Feststoff isoliert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet. Man erhält 0,81 g (84 % d. Th.) eines hellorangen Feststoffs.

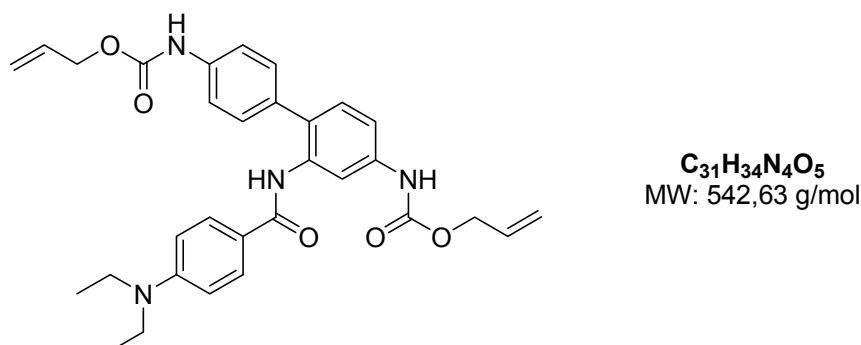
DC (CH₂Cl₂/MeOH 100:2) *R_f* = 0,23.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 3,03 (s, 6 H, CH₃), 4,62- 4,63 (m, 2 H, CH₂O), 4,67- 4,69 (m, 2 H, CH₂O), 5,21- 5,29 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,33- 5,44 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,94-6,04 (m, 2H, CH₂=CH), 6,90 (d, 2 H, H3', H3', ³*J* = 9 Hz), 7,61 (d, 2 H, H2', H2', ³*J* = 9 Hz), 7,74 (dd, 1 H, H2, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 7,96 (dd, 1 H, H9, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 8,17 (d, 1 H, H4, ³*J* = 2 Hz), 8,44 (d, 1 H, H7, ³*J* = 2 Hz), 8,59 (d, 1 H, H1, ³*J* = 9 Hz), 8,71 (d, 1 H, H10, ³*J* = 9 Hz), 10,09 (s, 2H, NH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 39,9 (2 CH₃), 64,7 (2 OCH₂), 111,5 (2 C3'), 115,5 (C7), 116,2 (C4), 117,5 (CH₂=CH), 117,7 (CH₂=CH), 118,1 (C10b), 118,2 (C2), 122,5 (C9), 122,6 (C1), 123,1 (C10), 124,4 (C6a), 126,8 (C1'), 128,3 (C10a), 130,7 (2 C2'), 133,1 (CH₂=CH), 133,2 (CH₂=CH), 137,5 (C8), 138,9 (C3), 143,4 (C4a), 150,5 (C4'), 153,2 (2 COOCH₂), 160,2 (C6).

ESI-MS *m/z* (%): 497,4 (100) [M+H⁺]⁺.

7.2.4.3. Synthese von 2-(4-*N,N*-Diethylamino)-phenylamido-4,4'-bis-allyloxycarbonylamino-biphenyl (26).



Zu einer Lösung aus 1,02 g (5,30 mmol) 4-Diethylaminobenzoessäure (**24**) in 20 mL abs. CH₂Cl₂ werden unter Stickstoffatmosphäre 1,2 mL (15,8 mmol) Thionylchlorid zugetropft. Nach 16 h Rühren bei RT wird das Reaktionsgemisch komplett eingedampft und am HV getrocknet. Das Rohprodukt (**25**) wird anschließend in 10 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit einer Lösung aus 1,16 g (3,21 mmol) **15** und 0,76 mL (4,70 mmol) DIPEA in 30 mL abs. CH₂Cl₂ versetzt. Die Reaktionslösung wird 3 d bei RT gerührt, anschließend mit Wasser und gesättigter NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über FC (CH₂Cl₂/ MeOH 100:1) gereinigt. Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Trocknen am HV erhält man 1,15 g (67 % d. Th.) eines gelblich weißen Feststoffs. Eine analysenreine Probe wird durch Umkristallisieren aus einer Et₂O-Hexan-Mischung erhalten.

DC (CH₂Cl₂/MeOH 100:3) *R_f* = 0,36.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,09 (t, 6 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 3,37 (q, 4 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 4,59-4,61 (m, 2 H, CH₂O), 4,62-4,64 (m, 2 H, CH₂O), 5,21-5,26 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,34-5,39 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,94-6,03 (m, 2H, CH₂=CH), 6,63 (d, 2 H, H3'', H5'', ³*J* = 7 Hz), 7,27 (d, 1 H, H6, ³*J* = 8 Hz), 7,33 (dd, 2 H, H2', H6', ³*J* = 7 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 7,43-7,46 (m, 3 H, H5, H3', H5'), 7,64-7,66 (m, 3 H, H3, H2'', H6''), 9,27 (s, 1 H, NH), 9,73 (s, 1 H, NH), 9,83(s, 1 H, NH).

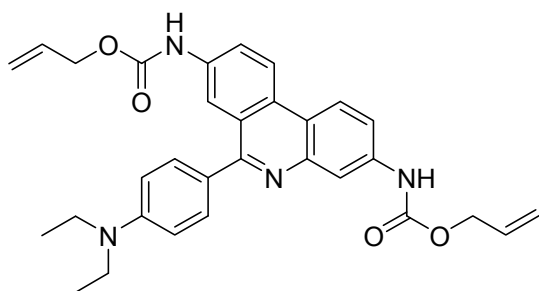
^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 12,3 (2 $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 43,7 (2 $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 64,6 (OCH_2), 64,7 (OCH_2), 110,1 ($\text{C}3''$, $\text{C}5''$), 115,9 ($\text{C}5$), 117,5 ($\text{C}3$), 117,6 (2 $\text{CH}_2\text{=CH}$), 117,9 ($\text{C}3'$, $\text{C}5'$), 119,8 ($\text{C}1''$), 129,0 ($\text{C}2'$, $\text{C}6'$), 129,2 ($\text{C}2''$, $\text{C}6''$), 130,1 ($\text{C}6$), 131,5 ($\text{C}1$), 133,1 ($\text{C}1'$), 133,3 ($\text{CH}_2\text{=CH}$), 133,3 ($\text{CH}_2\text{=CH}$), 135,6 ($\text{C}2$), 137,8 ($\text{C}4'$), 138,3 ($\text{C}4$), 149,6 ($\text{C}4''$), 153,2 (COOCH_2), 153,2 (COOCH_2), 165,3 (COPh).

2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

ESI-MS m/z (%): 543,4 (100) $[\text{M}+\text{H}]^+$, 1085,7 (11) $[2\text{M}+\text{H}]^+$, 1107,6 (6) $[2\text{M}+\text{Na}]^+$.

EA berechnet für $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_4\text{O}_5$ (542,63): C 68,62; H 6,32; N 10,33; gefunden: C 68,45; H 6,40; N 10,01.

7.2.4.4. Synthese von 3,8-Diallyloxycarbonylamino-6-(4-*N,N*-diethylamino)-phenyl-phenanthridin (27).



$\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4$
MW: 524,61 g/mol

1,05 g (1,94 mmol) **26** werden unter Stickstoffatmosphäre in 8,2 mL (87,4 mmol) POCl_3 6 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wird die Reaktionslösung auf 0 °C gekühlt und überschüssiges POCl_3 durch langsame Zugabe von Wasser vernichtet. Die Lösung wird durch Zutropfen von konz. NH_4OH auf pH 8 eingestellt, der entstehende Feststoff isoliert, mit Wasser gewaschen und am HV getrocknet. Man erhält 751 mg (74 % d. Th.) eines hellorangen Feststoffs.

DC (CH₂Cl₂/Aceton/EtOAc 50:2:2) $R_f = 0,28$.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,17 (t, 6 H, N(CH₂-CH₃)₂, $^3J = 7$ Hz), 3,44 (q, 4 H, N(CH₂-CH₃)₂, $^3J = 7$ Hz), 4,61- 4,64 (m, 2 H, CH₂O), 4,67- 4,69 (m, 2 H, CH₂O), 5,21- 5,29 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,34- 5,44 (m, 2 H, CH₂=CH), 5,94-6,08 (m, 2H, CH₂=CH), 6,80- 6,84 (m, 2 H, H3', H3'), 7,57- 7,61 (m, 2 H, H2', H2'), 7,74 (dd, 1 H, H2, $^3J = 9$ Hz, $^4J = 2$ Hz), 7,99 (dd, 1 H, H9, $^3J = 9$ Hz, $^4J = 1$ Hz), 8,17 (d, 1 H, H4, $^3J = 2$ Hz), 8,44 (d, 1 H, H7, $^3J = 1$ Hz), 8,59 (d, 1 H, H1, $^3J = 9$ Hz), 8,70 (d, 1 H, H10, $^3J = 9$ Hz), 10,09 (s, 2H, NH).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 12,4 (2 CH₂-CH₃), 43,6 (2 CH₂-CH₃), 64,7 (2 OCH₂), 110,6 (2 C3'), 115,6 (C7), 116,2 (C4), 117,5 (CH₂=CH), 117,7 (CH₂=CH), 118,1 (C10b), 118,2 (C2), 122,4 (C9), 122,6 (C1), 123,0 (C10), 124,4 (C6a), 125,7 (C1'), 128,4 (C10a), 131,0 (2 C2'), 133,1 (CH₂=CH), 133,2 (CH₂=CH), 137,5 (C8), 138,9 (C3), 143,5 (C4a), 147,6 (C4'), 153,2 (2 COOCH₂), 160,2 (C6).

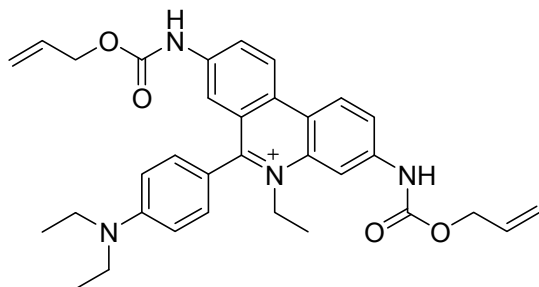
2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

ESI-MS m/z (%): 525,2 (100) [M+H]⁺.

HR-ESI-MS m/z (M⁺) berechnet für C₃₁H₃₂N₄O₄ (551,63): 524,2424; gefunden: 524,2424.

EA berechnet für C₃₁H₃₂N₄O₄·1,5 H₂O (551,63): C 67,50; H 6,40; N 10,16; gefunden: C 67,51; H 6,23; N 10,56.

7.2.4.5. Synthese von 3,8-Diallyloxycarbonylamino-5-ethyl-6-(4-*N,N*-diethylamino)-phenyl-phenanthridiniumiodid (**28**).



C₃₃H₃₇N₄O₄⁺
MW: 553,67 g/mol
C₃₃H₃₇I N₄O₄
MW: 680,58 g/mol

500 mg (0,95 mmol) **27** werden in 15 mL abs. THF unter Stickstoffatmosphäre gelöst, mit 3,1 mL (38,2 mmol) Iodethan versetzt und 7 d unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene Feststoff wird isoliert, gründlich mit Et₂O gewaschen und am HV getrocknet. Es werden 422 mg (65 % d. Th.) eines gelben Feststoffs erhalten.

DC (CH₂Cl₂/Aceton 3:1) *R_f* = 0,21.

¹H NMR (MeOH-*d*₄, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,29 (t, 6 H, N(CH₂-CH₃)₂, ³*J* = 7 Hz), 1,65 (t, 3 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 3,57 (q, 4 H, N(CH₂-CH₃)₂, ³*J* = 7 Hz), 4,61- 4,63 (m, 2 H, CH₂O), 4,74- 4,76 (m, 2 H, CH₂O), 4,89 (q, 2 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 5,20- 5,45 (m, 4 H, CH₂=CH), 5,89-6,10 (m, 2H, CH₂=CH), 7,01- 7,04 (m, 2 H, H3', H3'), 7,40- 7,43 (m, 2 H, H2', H2'), 7,94 (dd, 1 H, H2, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 8,00 (d, 1 H, H7, ³*J* = 2 Hz), 8,34 (dd, 1 H, H9, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 8,86- 8,95 (m, 3 H, H4, H1, H10, ³*J* = 2 Hz).

¹³C NMR (MeOH-*d*₄, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 12,8 (2 CH₂-CH₃), 15,1 (CH₂-CH₃), 45,4 (2 CH₂-CH₃), 51,4 (CH₂-CH₃), 66,8 (OCH₂), 67,1 (OCH₂), 108,0 (C4), 112,5 (2 C3'), 117,8 (C7), 118,1 (CH₂=CH), 118,4 (CH₂=CH), 120,4 (C10b), 122,6 (C2), 122,7 (C1'), 124,4 (C10), 126,3 (C1), 127,9 (C6a), 130,0 (C9), 131,1 (2 C2'), 131,9 (C10a), 133,8 (CH₂=CH), 133,9 (CH₂=CH), 135,8 (C4a), 141,4 (C8), 143,7 (C3), 151,2 (C4'), 155,2 (COOCH₂), 155,4 (COOCH₂), 166,5 (C6).

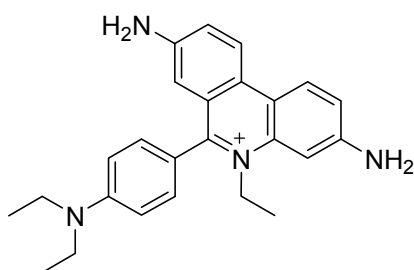
2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

ESI-MS *m/z* (%): 553,4 (100) [M]⁺.

HR-LSI-MS m/z (M^+) berechnet für $C_{33}H_{37}N_4O_4^+$: 553,2815; gefunden: 553,2817.

EA berechnet für $C_{33}H_{37}IN_4O_4 \cdot H_2O$ (698,59): C 56,74; H 5,63; N 8,02; gefunden: C 56,38; H 5,40; N 7,83.

7.2.4.6. Synthese von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4-*N,N*-diethylamino)-phenyl-phenanthridiniumtrifluoracetat (4).



$C_{25}H_{29}N_4^+$
MW: 385,52 g/mol
 $C_{27}H_{29}F_3N_4O_2$
MW: 498,54 g/mol

Zu einer Lösung aus 220 mg (0,32 mmol) **28** in 10 mL abs. CH_2Cl_2 und 30 μ L Wasser werden unter Stickstoffatmosphäre nacheinander 8,2 mg (7,1 μ mol) $Pd(PPh_3)_4$, 18,7 mg (0,07 mmol) PPh_3 und 0,28 mL (1,03 mmol) Bu_3SnH zugegeben. Nach 90 min. Rühren bei RT wird die Reaktion durch Zugabe von 7 mL Wasser abgebrochen. Die Reaktionslösung wird anschließend zur Trockene eingedampft und das Rohprodukt gründlich mit Et_2O gewaschen. Das Rohprodukt wird mittels HPLC auf einer präparativen RP-C18 Säule (A= H_2O (0,0059 % TFA), B= MeCN; Gradient= 10-85% B über 30 min) gereinigt und anschließend aus einer THF-Heptan-Mischung umkristallisiert. Es werden 93 mg (58 % d. Th.) dunkelrote plättchenförmige Kristalle erhalten.

DC (CH_2Cl_2 / MeOH 15:1) R_f = 0,11.

¹H NMR (MeOH-*d*₄, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 1,26 (t, 6 H, N(CH₂-CH₃)₂, ³*J* = 7 Hz), 1,52 (t, 3 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 3,52 (q, 4 H, N(CH₂-CH₃)₂, ³*J* = 7 Hz), 4,72 (q, 2 H, CH₂-CH₃, ³*J* = 7 Hz), 6,69 (d, 1H, H7, ³*J* = 2 Hz), 6,96- 6,99(m, 2 H, H3', H3'), 7,29- 7,32 (m, 2 H, H2', H2'), 7,32 (dd, 1 H, H2, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 7,36 (d, 1 H, H4, ³*J* = 2 Hz), 7,52 (dd, 1 H, H9, ³*J* = 9 Hz, ⁴*J* = 2 Hz), 8,50 (d, 1 H, H10, ³*J* = 9 Hz), 8,57 (d, 1 H, H1, ³*J* = 9 Hz).

¹³C NMR (MeOH-*d*₄, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 12,8 (2 CH₂-CH₃), 14,8 (CH₂-CH₃), 45,4 (2 CH₂-CH₃), 50,1 (CH₂-CH₃), 100,2 (C4), 111,5 (C7), 112,4 (2 C3'), 118,8 (C1'), 119,4 (C10b), 121,0 (C2), 123,6 (C10), 125,8 (C1), 127,6 (C6a), 128,9 (C9), 129,6 (C10a), 130,9 (2 C2'), 136,1 (C4a), 149,4 (C8), 150,7 (C4'), 152,6 (C3), 162,5 (C6).

2D-NMR-Experimente: **COSY, HSQC, HMBC, NOESY**

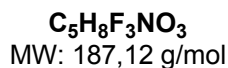
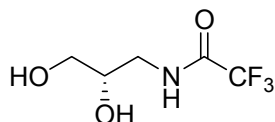
ESI-MS m/z (%): 385,1 (100) [M]⁺.

HR-LSI-MS m/z (M⁺) berechnet für C₂₅H₂₉N₄⁺: 385,2392; gefunden: 385,2397.

EA berechnet für C₃₇H₂₉F₃N₄O₂·0,5 H₂O (507,55): C 63,89; H 5,96; N 11,04; gefunden: C 63,57; H 6,32; N 10,63.

7.2.5. Darstellung des acyclischen Aminopropandiol-Linkers (31)

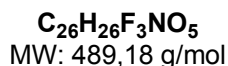
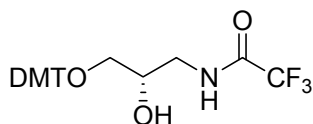
7.2.5.1. Synthese von *N*-((*S*)-2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoracetamid (29).^[200, 448]



1,44 g (15,70 mmol) (*S*)-(-)-3-Amino-propan-1,2-diol werden in 16 mL (158,4 mmol) Trifluoressigsäuremethylester suspendiert und bei RT über Nacht gerührt. Die Reaktionslösung wird im Vakuum eingengt und dreimal mit je 29 mL Toluol koevaporiert. Es werden 2,62 g (89 % d. Th.) einer gelblichen, stark viskosen Flüssigkeit erhalten.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[200, 448] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.5.2. Synthese von *N*-{(*S*)-3-[Bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl}-trifluoracetamid (30).^[200, 448]



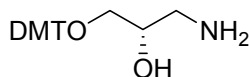
2,39 g (7,1 mmol) 4,4'-Dimethoxytriphenylmethylchlorid werden zu einer Lösung von 1,30 g (7,1 mmol) *N*-((*S*)-2,3-Dihydroxy-propyl)-trifluoroacetamid (29) in 22 mL absolutem Pyridin gegeben und unter Argonatmosphäre 12 h bei RT gerührt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,7 mL MeOH abgebrochen, 1 h bei RT gerührt und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wird in 65 mL EtOAc gelöst und dreimal mit je 35 mL gesättigter NaHCO₃-Lösung sowie zweimal mit je 35 mL H₂O gewaschen. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird über FC

(DCM + 0,1 % Pyridin, 0 - 2 % MeOH) gereinigt. Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Trocknen am HV erhält man 2,60 g (75 % d. Th.) einer farblosen, stark viskosen Flüssigkeit. **DC** (CH₂Cl₂/ MeOH 100:2) *R*_f= 0,33.

ESI-MS *m/z* (%):488,3 (100) [M-H⁺]⁻.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[200, 448] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.5.3. Synthese von (*S*)-1-Amino-3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-propan-2-ol (31). ^[200, 448]



C₂₄H₂₇NO₄
MW: 393,19 g/mol

Eine Lösung aus 1,87 g (3,82 mmol) **30** in 23 mL MeOH, 23 mL 25 %iger NH₄OH und 10 mL THF wird über Nacht bei RT gerührt. Nachdem THF und MeOH im Vakuum entfernt worden sind, wird dreimal mit je 60 mL DCM extrahiert. Die organische Phase wird mit 60 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Es werden 1,36 g (91 % d. Th.) eines weißen, erstarrten Schaums erhalten.

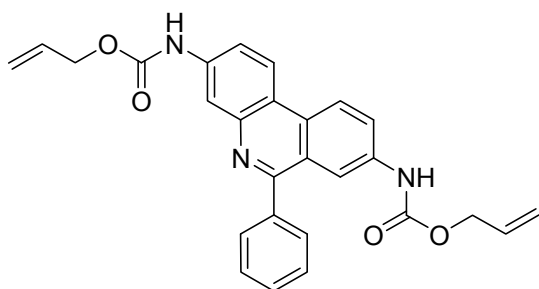
ESI-MS *m/z* (%):303,0 (100) [DMT]⁺, 787,5 (10) [2M+H⁺]⁺

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[200, 448] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.6. Darstellung des Ethidiumnukleosids (38)

7.2.6.1. Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (33).

[102, 409]



C₂₇H₂₃N₃O₄
MW: 453,49 g/mol

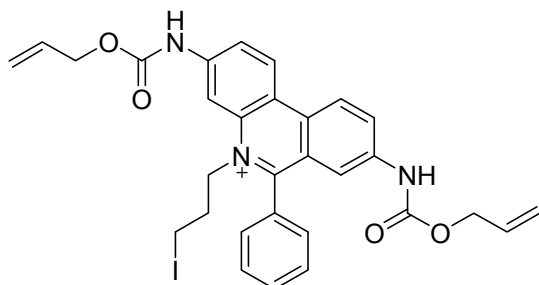
5,0 g (17,5 mmol) 3,8-Diamino-6-phenylphenanthridin (**32**) werden in 150 mL abs. CH₂Cl₂ suspendiert und vorsichtig mit 31,6 mL (298 mmol) Chlorameisensäureallylester versetzt. Nach 48 h Rühren bei RT wird das Reaktionsgemisch auf 1/6 des Volumens im Vakuum eingengt und anschließend mit 200 mL wässriger NH₃-Lösung (6 N) versetzt. Der braune Niederschlag wird abfiltriert, mit wenig H₂O gewaschen und im HV getrocknet. Man erhält 7,07 g (89 % d. Th.) eines braunen Feststoffs.

DC (EtOAc/ MeOH/H₂O 6:2:1) *R_f*= 0,94.

ESI-MS *m/z* (%): 454,1 (100) [M+H]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[102, 409] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.6.2. Synthese von 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-iodpropyl)-6-phenyl-phenanthridiniumiodid (34). ^[102, 409]



C₃₀H₂₉I_{N₃O₄}⁺
 MW: 622,47 g/mol
C₃₀H₂₉I₂N₃O₄
 MW: 749,38 g/mol

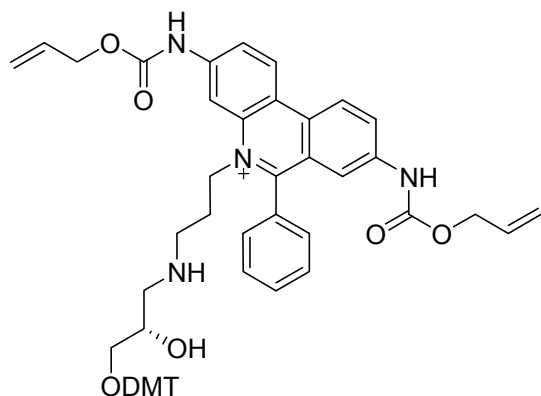
6,5 g (14,3 mmol) 3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-6-phenyl-phenanthridin (**33**) werden in 50 mL abs. THF gelöst. Nach Zugabe von 17 mL (145 mmol) 1,3-Diiiodpropan wird 9 Tage unter Rückfluss erhitzt. Der ausgefallene, gelb-orange Niederschlag wird isoliert, mit sehr wenig kaltem THF gewaschen und im HV getrocknet. Es werden 9,8 g (92 % d. Th.) eines gelben Feststoffs erhalten.

DC (CH₂Cl₂/ MeOH 20:3) *R_f*= 0,34.

ESI-MS *m/z* (%): 622,1 (100) [M]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[102, 409] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.6.3. Synthese von (*S*)-3,8-Bis-allyloxycarbonylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-6-phenylphenanthridiniumiodid (35).^[102, 409]



C₅₄H₅₅N₄O₈⁺
 MW: 887,40 g/mol
C₅₄H₅₅I₄O₈
 MW: 1014,31 g/mol

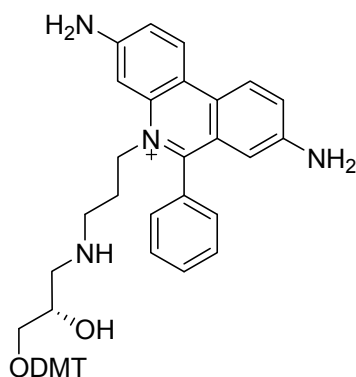
Zu einer Lösung von 3,3 g (4,4 mmol) **34** und 1,3 mL (8,8 mmol) DIPEA in 177 mL DMF werden 1,9 g (6,6 mmol) des Aminopropandiol-Linkers (**31**) gegeben und 40 h bei RT gerührt. Anschließend werden weitere 0,70 g (1,8 mmol) **31** und 0,65 mL (4,4 mmol) DIPEA zugegeben und für 15 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über FC (CH₂Cl₂/MeOH 100:3 + 0.1 % Pyridin → CH₂Cl₂/MeOH 10:3 + 0.1 % Pyridin). Man erhält 4,0 g (89 % d. Th.) eines gelb-braunen Feststoffs.

DC (CH₂Cl₂/ MeOH 10:3) *R_f* = 0,80.

ESI-MS *m/z* (%): 303,1 (6) [DMT]⁺, 585,2 (12) [M+H⁺-DMT]⁺, 887,5 (100) [M]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[102, 409] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.6.4. Synthese von (*S*)-3,8-Bis-amino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxy-phenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propylamino}-propyl)-6-phenylphenanthridinium-iodid (36**).^[102, 409]**



C₄₆H₄₇N₄O₄⁺
 MW: 719,36 g/mol
C₄₆H₄₇IN₄O₄
 MW: 846,26 g/mol

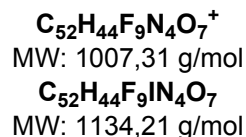
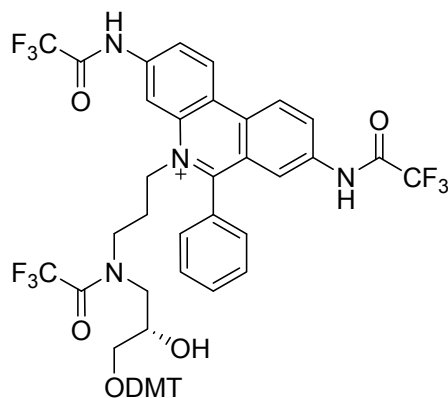
1,9 g (2,0 mmol) **35** werden in 65 mL abs. CH₂Cl₂ und 0,2 mL H₂O gelöst. Zu dieser Lösung werden 49,8 mg (0,043 mmol) Pd(PPh₃)₄, 113 mg (0,43 mmol) PPh₃ und 1,9 g (6,53 mmol) Bu₃SnH gegeben. Der Ansatz wird 90 min. bei RT gerührt. Durch Zugabe von 50 mL H₂O wird die Reaktion abgebrochen. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt. Die Reinigung erfolgt über FC (CH₂Cl₂/MeOH 100:5 + 0.1 % Pyridin → EtOAc/MeOH/H₂O 6:2:2 + 0.1 % Pyridin). Es werden 1,2 g (58 % d. Th.) eines violetten Feststoffs erhalten.

DC (EtOAc/MeOH/H₂O 6:2:2) *R_f* = 0,62.

ESI-MS *m/z* (%): 303,1 (8) [DMT]⁺, 719,4 (100) [M]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur^[102, 409] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.6.5. Synthese von (*S*)-3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-(3-{3-[bis-(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]-2-hydroxy-propyl-*N*-(trifluoroacetyl)-amino}-propyl)-6-phenylphenanthridiniumiodid (37). ^[102, 409]

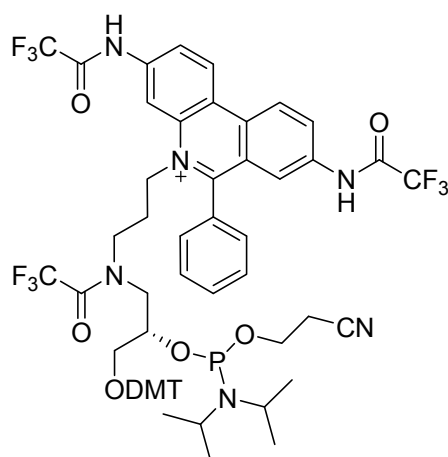


622 mg (0,73 mmol) **36** werden in 4 mL abs. DCM gelöst, mit 0,74 mL (8,7 mmol) abs. Pyridin versetzt und auf 0 °C gekühlt. Anschließend werden 0,63 mL (4,3 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid zugetropft. Zunächst wird der Ansatz 10 min. bei 0 °C, dann weitere 10 min. bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wird kurz mit 7,3 mL ges. NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die organische Phase wird über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Nach Trocknen am HV erhält man 616 mg (73 % d. Th.) eines braunen schaumigen Feststoffs.

MALDI-MS m/z (%): 1007,6 (100) [M]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[102, 409] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.6.6. Synthese von (S)-3,8-Bis-trifluoroacetylamino-5-(3-{(3-[bis-(4-methoxyphenyl)-phenyl-methoxy]-2-[(2-cyano-ethoxy)-N,N-diisopropylaminophosphanyloxy]-propyl)-(2,2,2-trifluoroacetyl)-amino}-propyl)-6-phenylphenanthridiniumiodid (38). ^[102, 409]



C₆₁H₆₁F₉N₆O₈P⁺
 MW: 1207,41 g/mol
C₆₁H₆₁F₉I N₆O₈P
 MW: 1334,32 g/mol

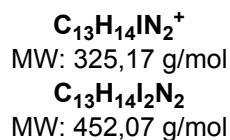
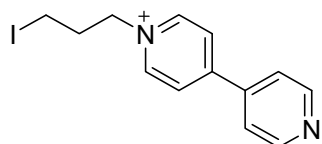
410 mg (0,362 mmol) **37** werden in 17 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und mit 289 µL (1,45 mmol) trockenem DIPEA versetzt. Anschließend werden 161 µL (0,725 mmol) 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit zugegeben. Nach 30 min. Rühren bei RT wird die Reaktionsmischung rasch mit frisch hergestellter, ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird sofort über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Es werden 460 mg (95 % d. Th.) eines gelblich braunen Öls erhalten.

MALDI-MS m/z (%): 1206.9 (100) [M]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[102, 409] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.7. Darstellung von *N*-(3-Azidopropyl)-*N'*-methyl-4,4'-bipyridiniumiodid (42)

7.2.7.1. Synthese von *N*-(3-Iodpropyl)-4,4'-bipyridiniumiodid (40). ^[426]



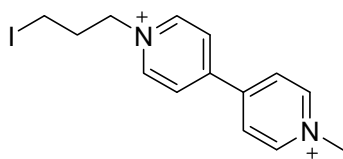
1,18 g (7,5 mmol) 4,4'-Bipyridin (**39**) werden unter Stickstoffatmosphäre in 8 mL (69,6 mmol) Diiodpropan suspendiert und ca. 1 h mit Ultraschall behandelt. Anschließend wird die Reaktionsmischung über Nacht bei RT gerührt, nochmals mit 3 mL (26,1 mmol) Diiodpropan versetzt und erneut über Nacht bei RT gerührt. Nach Zugabe von ca. 100 mL Et₂O fällt gelber Feststoff aus, der isoliert, mit Et₂O gewaschen und am HV getrocknet wird. Das Rohprodukt wird zur Reinigung aus einer MeCN-Et₂O-Mischung umkristallisiert, mit Et₂O gewaschen und am HV getrocknet. Man erhält 3,02 g (89 % d. Th.) orangefarbene, nadelförmige Kristalle.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 2,54 (m, 2 H, CH₂-2), 3,28 (t, 2H, CH₂-3, ³*J*= 7 Hz), 4,70 (t, 2H, CH₂-1, ³*J*= 7 Hz), 8,05 (dd, 2 H, 2 H3', ³*J*= 5 Hz, ⁴*J*= 2 Hz), 8,66 (d, 2 H, 2 H3, ³*J*= 7 Hz), 8,87 (dd, 2 H, 2 H2', ³*J*= 5 Hz, ⁴*J*= 2 Hz), 9,24 (d, 2 H, 2 H2, ³*J*= 7 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 0,0 (CH₂-CH₂-CH₂-I) 32,6 (CH₂-CH₂-CH₂-I), 59,5 (CH₂-CH₂-CH₂-I), 120,5 (2 C3'), 124,0 (2 C3), 139,4 (C4'), 144,1 (2 C2'), 149,5 (2 C2), 150,9 (C4).

ESI-MS *m/z* (%): 324,9 (100) [M⁺].

7.2.7.2. Synthese von *N*-(3-Iodpropyl)-*N*'-methyl-4,4'-bipyridiniumiodid (**41**)



C₁₄H₁₇I₂N₂²⁺
 MW: 340,20 g/mol
C₁₄H₁₇I₃N₂
 MW: 594,01 g/mol

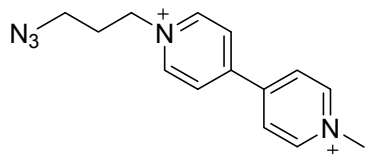
2,54 g (5,62 mmol) **40** werden unter Stickstoffatmosphäre in 70 mL absolutem MeCN suspendiert und mit 3 mL (48,2 mmol) Iodmethan versetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wird das Reaktionsgemisch bis zur Trockene eingedampft, gründlich mit heißem EtOH gewaschen und am HV getrocknet. Man erhält 1,52 g (46 % d. Th.) eines roten Feststoffs.

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 2,56 (m, 2 H, CH₂-2), 3,28 (t, 2H, CH₂-3, ³*J* = 7 Hz), 4,44 (s, 3H, CH₃), 4,74 (t, 2H, CH₂-1, ³*J* = 7 Hz), 8,78 (d, 2 H, 2 H3', ³*J* = 7 Hz), 8,82 (d, 2 H, 2 H3, ³*J* = 7 Hz), 9,30 (d, 2 H, 2 H2', ³*J* = 7 Hz), 9,38 (d, 2 H, 2 H2, ³*J* = 7 Hz).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz, 294,7 K): δ (ppm) 0,0 (CH₂-CH₂-CH₂-I) 32,7 (CH₂-CH₂-CH₂-I), 46,8 (CH₃), 60,1 (CH₂-CH₂-CH₂-I), 124,8 (2 C3), 125,3 (2 C3'), 144,7 (2 C2), 145,4 (2 C2'), 146,7 (C4), 147,3 (C4').

ESI-MS *m/z* (%): 171,0 (18) [M-C₃H₆I]⁺, 338,9 (48) [M-H]⁺, 339,9 (100) [M]⁺.

EA berechnet für C₁₄H₁₇I₃N₂ (349,21): C 28,31; H 2,88; N 4,72. gefunden: C 28,31; H 2,94; N 4,64.

7.2.7.3. Synthese von *N*-(3-Azidopropyl)-*N*'-methyl-4,4'-bipyridiniumiodid (42)

C₁₄H₁₇N₅²⁺
MW: 255,32 g/mol

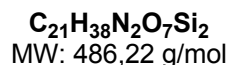
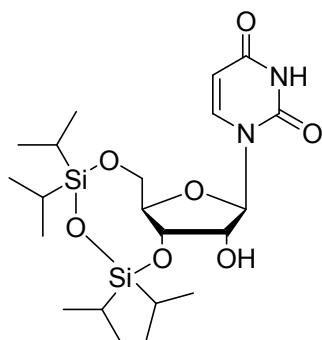
C₁₄H₁₇I₂N₅
MW: 509,13 g/mol

0,30 g (0,5 mmol) **41** und 0,13 g (1,5 mmol) Natriumazid werden in 0,5 mL Wasser gelöst. Das Reaktionsgemisch wird über Nacht bei 80 °C gerührt und anschließend zur Trockene eingedampft. Zum Entfernen des überschüssigen Natriumazids wird der Feststoff in 0,5 mL MeOH aufgenommen, abfiltriert und am HV getrocknet. Man erhält 0,23 g (90 % d. Th.) eines braunen Feststoffs.

ESI-MS m/z (%): 255,0 (60) [M⁺], 300,0 (100) [M²⁺+HCOO⁻]⁺, 368,0 (20) [M²⁺+TFA⁻]⁺.

7.2.8. Darstellung des alkinylmodifizierten Uridins (49)

7.2.8.1. Synthese von 5'-*O*-(Tetraisopropylidisiloxan-1,3-diyl)-uridin (44) ^[299]



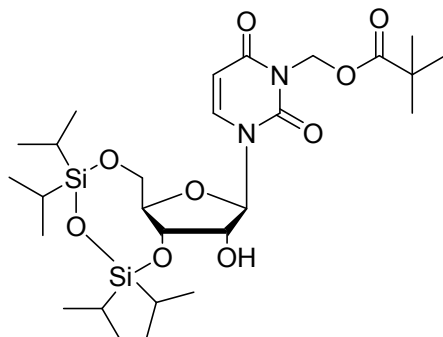
6,0 g (24,6 mmol) Uridin (**43**) werden in 80 mL abs. Pyridin gelöst, mit 8,7 mL (27 mmol) 1,3-Dichloro-1,1,3,3-tetraisopropylidisiloxan versetzt und 6 h lang bei RT gerührt. Nach Zugabe von 15 mL H₂O wird die Reaktionslösung mit gesättigter NaHCO₃-Lösung neutralisiert. Die Reaktionslösung wird eingedampft, der Rückstand in 150 mL EtOAc gelöst und dreimal mit 150 mL H₂O extrahiert. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wird über FC gereinigt (CH₂Cl₂/Aceton 4:1). Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Trocknen am HV erhält man 8,7 g (73 % d. Th.) eines farblosen schaumigen Feststoffs.

DC (CH₂Cl₂/ Aceton 4:1) *R_f*= 0,33.

ESI-MS *m/z* (%): 487,3 (100) [M+H]⁺, 504,4 (20) [M+NH₄]⁺, 973,7 (10) [2M+H]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[299] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.8.2. Synthese von 3',5'-*O*-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-*N*³-pivaloyloxymethyl-uridin (**45**) ^[299]



C₂₇H₄₈N₂O₉Si₂
MW: 600,29 g/mol

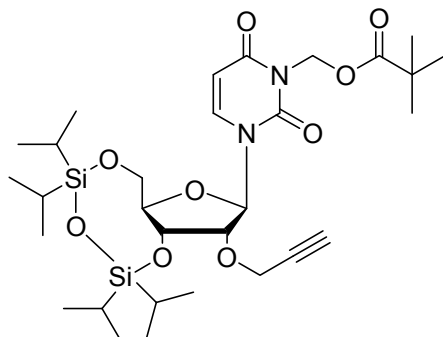
2,1 g (4,3 mmol) 5'-*O*-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-uridin (**44**) gelöst 100 mL CH₂Cl₂ werden mit 200 mL (0,2 M) Na₂CO₃-Lösung und 0,35 g (1,0 mmol) TBAHS versetzt. Anschließend werden unter Rühren 6,2 mL (41 mmol) Pivaloylmethylchlorid zugegeben und 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die organische Phase wird zweimal mit je 100 mL (5-%ig) NaHCO₃-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt am HV getrocknet. Das Rohprodukt wird über FC gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH 30:1). Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Trocknen am HV erhält man 1,8 g (69 % d. Th.) eines farblosen schaumigen Feststoffs.

DC (CH₂Cl₂/ MeOH 30:1) *R*_f= 0,60.

ESI-MS *m/z* (%): 601,3 (100) [M+H⁺]⁺, 618,3 (35) [M+NH₄⁺]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[299] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.8.3. Synthese von 3',5'-*O*-(Tetraisopropyldisiloxan-1,3-diyl)-*N*³-pivaloyloxymethyl-2'-*O*-propargyluridin (46) ^[299]



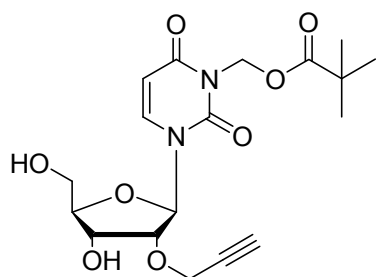
C₃₀H₅₀N₂O₉Si₂
MW: 638,31 g/mol

2,43 g (4,05 mmol) **45** werden in 30 mL abs. MeCN gelöst und im Eisbad auf 0 °C gekühlt. Es werden nacheinander 1,9 mL (6,6 mmol) BEMP und 0,64 mL (6,1 mmol) Propargylbromid zugegeben. Die Lösung wird 15 min bei 0 °C und 2 h bei RT gerührt. Nach Eindampfen des Lösungsmittels wird der Rückstand in 75 mL EtOAc gelöst, mit 75 mL (0,5 M) Phosphatpuffer und 75 mL gesättigter NaCl-Lösung gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wird im Vakuum entfernt und das Rohprodukt am HV getrocknet. Die Reinigung des Rohproduktes erfolgt über FC (CH₂Cl₂/MeOH 100:1). Nach Eindampfen des Lösungsmittels und Trocknen am HV erhält man 1,17 g (45 % d. Th.) eines farblosen schaumigen Feststoffs.

DC (CH₂Cl₂/ MeOH 100:1) *R_f* = 0,40.

ESI-MS *m/z* (%): 639,2 (100) [M+H]⁺, 656,3 (60) [M+NH₄]⁺, 1294,9 (20) [2M+H]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[299] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.8.4. Synthese von *N*³-Pivaloyloxymethyl-2'-*O*-propargyluridin (47) [299]

C₁₈H₂₄N₂O₈
MW: 396,15 g/mol

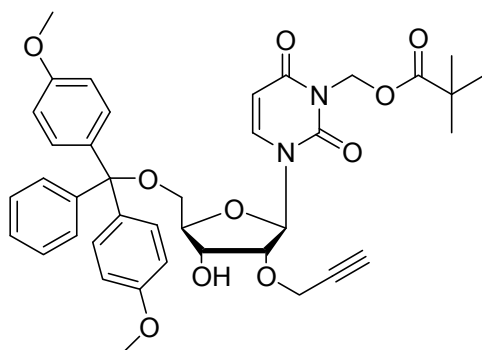
1,17 g (1,83 mmol) **46** werden in 15 mL THF gelöst und mit 1,6 mL (9,52 mmol) Et₃N·HF versetzt. Die Reaktionslösung wird über Nacht bei RT gerührt und anschließend eingedampft. Der Rückstand wird in 3,7 mL MeOH gelöst und mit 1 M NaOH neutralisiert. Nach erneutem Eindampfen erfolgt die Reinigung des Rohproduktes über FC (CH₂Cl₂/MeOH 10:1). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Trocknen am HV erhält man 0,64 g (88 % d. Th.) eines farblosen schaumigen Feststoffs.

DC (CH₂Cl₂/ MeOH 10:1) *R_f* = 0,43.

ESI-MS *m/z* (%): 397,1 (100) [M+H⁺]⁺, 419,1 (25) [M+Na⁺]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur [299] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.8.5. Synthese von 5'-*O*-Dimethoxytrityl-*N*³-pivaloyloxymethyl-2'-*O*-propargyluridin (48) ^[299]



C₃₉H₄₂N₂O₁₀
MW: 698,28 g/mol

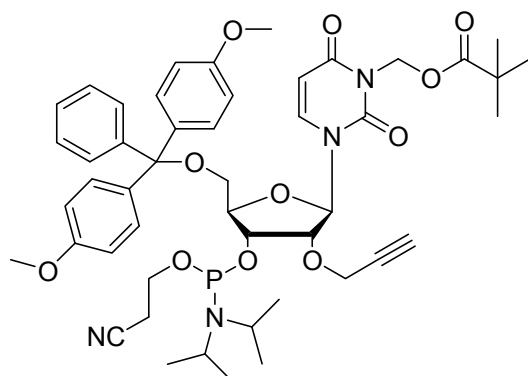
0,64 g (1,62 mmol) **47** werden dreimal in je 10 mL trockenem Pyridin koevaporiert und anschließend in 14 mL trockenem Pyridin gelöst. Dann werden 854 mg (2,51 mmol) 4,4'-Dimethoxytritylchlorid zur Lösung gegeben und über Nacht bei RT gerührt. Durch Zugabe von 1 mL MeOH wird die Reaktion abgebrochen und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Rückstand wird in 50 mL EtOAc aufgenommen und mit ca. 50 mL (1 M) Na₂CO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingedampft. Das Rohprodukt wird über FC gereinigt (Hexan/EtOAc 2:1 + 3 % Triethylamin). Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum und Trocknen am HV erhält man 0,72 g (64 % d. Th.) eines farblosen schaumigen Feststoffs.

DC (Hexan/EtOAc 2:1) *R*_f = 0,12.

ESI-MS *m/z* (%): 303,0 (53) [DMT]⁺, 716,5 (100) [M+NH₄⁺]⁺.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[299] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.2.8.6. Synthese von 5'-*O*-Dimethoxytrityl-*N*³-pivaloyloxymethyl-2'-*O*-propargyluridin-3'-*O*-(2-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidit) (49) ^[299]



C₄₈H₅₉N₄O₁₁P
MW: 898,98 g/mol

360 mg (0,52 mmol) **48** werden in 15 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst. Nach Zugabe von 220 µL (1,29 mmol) DIPEA und 137 µL (0,62 mmol) 2-Cyanoethoxy-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit wird die Reaktionsmischung für 3 h bei RT gerührt. Dann werden 45 mL CH₂Cl₂ zugegeben und mit 45 mL ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen. Die organische Phase wird über MgSO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingedampft. Anschließend wird das Rohprodukt über FC gereingt (Hexan/EtOAc 1,5:1 + 3 % Triethylamin) und aus Benzol lyophilisiert. Man erhält 370 mg (79 % d. Th.) eines farblosen schaumigen Feststoffs.

DC (Hexan/EtOAc 1,5:1) *R*_f = 0,41.

Die NMR-spektroskopischen Daten stimmen mit der Literatur ^[299] überein und werden daher nicht mehr explizit angegeben.

7.3. Charakterisierung von Ethidium und 1-4

7.3.1. Untersuchung der photophysikalischen Eigenschaften

UV/Vis Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie

Absorptions- und Fluoreszenzspektren wurden mit einer Chromophor-Konzentration von 25 μM aufgenommen (in Glycerin: 10 μM). Die jeweiligen Stammlösungen der Chromophore wurden in Eppendorf-Cups portioniert, in Stickstoff ausgefroren und gefriergetrocknet. Anschließend wurden die entsprechenden Mengen der Lösungsmittel zu den Farbstoffen eingewogen (die wässrigen Pufferlösungen wurden pipettiert), so dass sich eine Endkonzentration von 25 μM ergab (in Glycerin: 10 μM). Die Spaltbreite zur Messung der Fluoreszenz betrug jeweils 2 nm für Anregung und Emission. Zur Glättung der Absorptions- und Fluoreszenzspektren wurde die Glättungsroutine „gleitender Durchschnitt“ (*Origin7.5*) unter Verwendung von 5 Datenpunkten angewandt.

Tabelle 7-1: Absorptionsmaxima und Extinktionskoeffizienten von **E** und **1-4** in verschiedenen Lösungsmitteln ($c = 25 \mu\text{M}$; in Glycerin: 10 μM).

Lösungsmittel	$\lambda_{\text{Abs}} / \text{nm} (\epsilon / \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$				
	E	1	2	3	4
NaP_i-Puffer (pH7)	285 (51950)	250 (42460)	251 (44250)	282 (50830)	281 (63310)
	479 (5420)	315 (6640)	322 (7640)	463 (4640)	485 (8180)
		369 (3830)	377 (4880)		
NaP_i-Puffer (pH3)	284 (49950)	249 (38930)	250 (43710)	282 (49670)	285 (47520)
	478 (5230)	315 (6090)	322 (7490)	463 (4450)	487 (5600)
		370 (3560)	377 (4830)		
NaP_i-Puffer (pH13)	284 (49690)	249 (29110)	250 (39270)	282 (49190)	281 (61430)
	479 (5110)	315 (4480)	322 (6690)	465 (4390)	483 (7610)
		370 (2580)	378 (4210)		
Aceton	522 (5860)	366 (4020)	377 (4420)	501 (3250)	521 (8740)
CH₂Cl₂	514 (5630)	378 (3850)	385 (5110)	501 (3290)	518 (9500)
DMSO	537 (5750)	364 (3520)	374 (4740)	516 (2740)	534 (8310)
MeCN	512 (5880)	368 (3720)	376 (4670)	493 (4440)	513 (9240)
MeOH	525 (5860)	368 (3810)	376 (4630)	504 (4960)	521 (8650)
THF	545 (5430)	365 (7260)	357 (12210)	526 (2330)	542 (7600)
Glycerin	515 (5420)	369 (3270)	377 (5120)	495 (5130)	517 (8920)

Tabelle 7-2: Fluoreszenzmaxima und Stoke-Shifts von **E** und **1-4** in verschiedenen Lösungsmitteln (c= 25 µM; in Glycerin: 10 µM).

Lösungsmittel	$\lambda_{Fl}/\text{nm} (\Delta\lambda/\text{nm})$				
	E	1	2	3	4
NaP_i-Puffer (pH7)	617 (138)	408 (39)	420 (43)	599 (136)	616 (131)
NaP_i-Puffer (pH3)	618 (140)	408 (39)	420 (43)	598 (135)	627 (140)
NaP_i-Puffer (pH13)	617 (138)	408 (38)	420 (42)	599 (135)	611 (128)
Aceton	619 (97)	408 (44)	420 (43)	599 (98)	615 (94)
CH₂Cl₂	583 (69)	414 (36) ^[a]	422 (37) ^[b]	564 (63)	622 (104)
DMSO	646 (110)	416 (52)	424 (50)	620 (104)	642 (108)
MeCN	611 (99)	408 (41)	420 (44)	591 (98)	608 (95)
MeOH	626 (101)	411 (43)	422 (46)	606 (103)	623 (102)
THF	627 (82)	421 (56)	414 (57)	614 (88)	642 (100)
Glycerin	621 (106)	410 (41)	420 (43)	604 (109)	614 (97)

^[a]Zusätzliche Schulter bei 399 nm. ^[b]Zusätzliche Schulter bei 403 nm.

Fluoreszenzquantenausbeuten

Die Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F wurde nach der Standardmethode^[449] mit Hilfe eines Referenzfarbstoffs bekannter Quantenausbeute gemäß folgender Formel bestimmt:

$$\Phi_F = \Phi_{St} \cdot \frac{A_{St} \cdot n_{Pr}^2 \cdot F_{Pr}}{A_{Pr} \cdot n_{St}^2 \cdot F_{St}} \quad \text{Gleichung 7-1}$$

Darin steht der tiefgestellte Index *St* für den Referenzstandard, *Pr* für die untersuchte Probe. *n* ist der Brechungsindex des verwendeten Lösungsmittels, *A* die Absorption an der Anregungswellenlänge und *F* die integrierte Fluoreszenz.

Zur Bestimmung der Quantenausbeute von **E**, **3** und **4** diene Rhodamin 101 in EtOH ($\Phi_F=1,0$)^[376] als Standard, während für **1** und **2** eine schwefelsaure Chininsulfatlösung ($\Phi_F=0,546$)^[376] als Referenz verwendet wurde.

Tabelle 7-3: Fluoreszenzquantenausbeuten von **E** und **1-4** in verschiedenen Lösungsmitteln ($c = 25 \mu\text{M}$; in Glycerin: $10 \mu\text{M}$).

Lösungsmittel	Quantenausbeute $\Phi_F / 10^{-2}$				
	E	1	2	3	4
NaP_i-Puffer (pH7)	1,2	36	25	1,7	0,016 (1,3) ^[a]
NaP_i-Puffer (pH3)	1,6	35	24	2,0	0,52 (43) ^[a]
NaP_i-Puffer (pH13)	0,78	35	22	1,2	0,017 (1,4) ^[a]
Aceton	14	31	34	8,8	0,22 (19) ^[a]
CH₂Cl₂	30	7,4	7,8	51	1,6 (131) ^[a]
DMSO	3,6	7,1	51	2,1	0,55 (46) ^[a]
MeCN	16	21	24	20	0,041 (3,4) ^[a]
MeOH	7,0	29	16	14	0,55 (46) ^[a]
THF	1,3	2,9	7,6	3,3	1,7 (141) ^[a]
Glycerin	9,6	37	34	15	2,6

^[a]Quantenausbeuten relativ zu Ethidium.

Untersuchte Lösungsmittelparameter

Zur Quantifizierung der Lösungsmittelabhängigkeit von Absorption und Fluoreszenz wurden die Orientierungspolarisation Δf (*orientation polarizability*; Berechnung vgl. Kapitel 3.2.1 Gleichung 3-10), die $E_T(30)$ -Werte, die Donor- und Akzeptornummern sowie die β -Werte als Lösungsmittelparameter untersucht. Die Werte der jeweiligen Lösungsmittel befinden sich in Tabelle 7-4.

Tabelle 7-4: Dielektrizitätskonstanten ϵ , Brechungsindizes n_D^{20} , Orientierungspolarisation Δf ,^[381, 450, 451] $E_T(30)$ -Werte,^[67] Donor-(DN)^[379] und Akzeptornummern (AN)^[377] sowie β -Werte^[380] der verwendeten Lösungsmittel.

Lösungsmittel	ϵ	n_D^{20}	Δf	$E_T(30)/$ kcal·mol ⁻¹	DN/ kcal·mol ⁻¹	AN	β
NaP_i-Puffer (pH 7)^[a]	80	1,333	0,3201	63,1	26,7 ^[b]	54,8	0,181
Aceton	20,7	1,359	0,2842	42,2	17	12,5	0,478
CH₂Cl₂	9,1	1,424	0,2186	41,1	1,0	20,4	-
DMSO	47,2	1,479	0,2634	45,0	29,8	19,3	0,764
MeCN	36,6	1,344	0,3050	46,7	14,1	18,9	0,310
MeOH	33	1,329	0,3086	55,5	19,0	41,3	0,615
THF	7,52	1,407	0,2089	37,4	20,0	8,0	0,550

^[a]Für wässrige NaP_i-Puffer-Lösungen ($c = 10 \text{ mM}$) bei pH 7 wurden die Werte von Wasser zur Abschätzung verwendet. ^[b]DN von Wasser nach Stangret.^[378]

7.3.2. Untersuchung des Bindungsverhaltens an DNA

Alle Titrationsexperimente wurden bei 20 °C in Quarzglasküvetten durchgeführt. Sowohl die Farbstofflösungen als auch die Titrationslösungen wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer hergestellt. Für die Titrationen wurde ein aus 17 Basenpaaren (Bp) bestehender DNA Strang verwendet (**DNA1**), dessen Sequenz beliebig gewählt war.

UV/Vis Absorptionstitrationen

Bei allen Absorptionstitrationen wurden 500 µL einer 23 µM Farbstofflösung in der Küvette vorgelegt. Um eine Verdünnung der Farbstofflösung in der Küvette zu vermeiden, enthielt die Titrationslösung neben 357 µM DNA-Bp auch Farbstoff in gleicher Konzentration wie er in der Küvette vorgelegt wurde (23 µM). Die Titrationslösung wurde in 5, 10, 20, 50 und 100 µL Schritten zugegeben und durch Aufnahme von Absorptionsspektren (im Bereich von 220- 620 nm) überwacht. Die Zugabe der Titrationslösung wurde gestoppt nachdem keine weiteren Änderungen in den Absorptionsspektren detektierbar waren. Um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten wurde jede Titration mindestens dreimal durchgeführt.

Fluoreszenztitrationen

Bei allen Fluoreszenztitrationen wurden 500 µL einer 2,4 µM Farbstofflösung in der Küvette vorgelegt. Um eine Verdünnung der Farbstofflösung in der Küvette zu vermeiden, enthielt die Titrationslösung neben 192 µM DNA-Bp auch Farbstoff in gleicher Konzentration wie er in der Küvette vorgelegt wurde (2,4 µM). Die Titrationslösung wurde in 5, 10, 20, 50 und 100 µL Schritten zugegeben und durch Aufnahme von Fluoreszenzspektren verfolgt. Als Anregungswellenlänge wurde jeweils der langwelligste isosbestische Punkt gewählt, der sich aus den Absorptionstitrationen ergab. Die Fluoreszenzspektren der Chromophore **1** und **2** wurden mit einem Durchlassbereich von 2 nm aufgenommen, für Ethidium und die Chromophore **3** und **4** wurde ein Durchlassbereich von 5 nm gewählt. Die Zugabe der Titrationslösung wurde gestoppt nachdem keine weiteren Änderungen in den Fluoreszenzspektren detektierbar waren. Um Reproduzierbarkeit zu gewährleisten wurde jede Titration mindestens dreimal durchgeführt.

Bindungskonstanten

Zur Bestimmung der Bindungskonstante K und der Anzahl belegter Bindungsplätze n von **E** und **1-4** wurden die Werte aus den Absorptionstitrationen (am langwelligsten Absorptionsmaximum des freien Farbstoffs; bei **1**: 315 nm, bei **2**: 322 nm) verwendet. Mit Hilfe dieser

Werte lässt sich über die Berechnung der Sättigungsfraction SF die Menge an freiem $[L_f]$ und gebundenem Farbstoff $[L_b]$ sowie die Bindungsdichte r für jeden Titrationsschritt bestimmen (vgl. Kapitel 3.2.3). Aus der Auftragung von $r/[L_f]$ gg. r erhält man durch nicht lineare Regression entsprechend der Gleichung von *McGhee* und von *Hippel* die Werte für die Bindungskonstante K und die Anzahl belegter Bindungsplätze n . Um systematische Ungenauigkeiten zu vermeiden, gingen in die Auswertung nur Messpunkte mit einer Sättigungsfraction zwischen 0,3 und 0,85 ein.

7.3.3. Viskositätsabhängigkeit von Absorption und Fluoreszenz

Die Viskosität des Lösungsmittels wurde auf zwei unterschiedliche Arten systematisch variiert: (i) reines Glycerin, dessen Viskosität sich temperaturabhängig stark ändert, wurde bei verschiedenen Temperaturen eingesetzt und (ii) Glycerin-Wasser Mischungen unterschiedlicher Viskosität wurden bei konstanter Temperatur (20 °C) verwendet.

Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie in Glycerin bei verschiedenen Temperaturen

Die Viskosität von Glycerin ändert sich stark in Abhängigkeit von der Temperatur.^[396] Zur Untersuchung der Auswirkungen der Viskosität auf Absorption und Fluoreszenz der Chromophore wurden diese in hochreinem wasserfreiem Glycerin (*spectrophotometric grade, Sigma-Aldrich*) in einem Temperaturbereich von 0- 100 °C vermessen, was einer nicht-linearen Viskositätsänderung von 12070 cP auf 14,8 cP entspricht. Dazu wurden die jeweiligen Stammlösungen der Farbstoffe in Eppendorf-Cups portioniert, in Stickstoff ausgefroren und gefriergetrocknet. Anschließend wurde die entsprechende Menge Glycerin zu den Farbstoffen eingewogen, so dass sich eine Endkonzentration von 10 µM ergab. Zum Lösen der Chromophore wurden die Eppendorf-Cups geschlossen in ein warmes (50- 60°C) Ultraschallbad gegeben und ca. 40 min. mit Ultraschall behandelt. Die Proben wurden in Quarzglasküvetten überführt und in einem Temperaturbereich von 0- 100 °C in 5- 10 °C Schritten, wie in Kapitel 7.3.1 beschrieben, vermessen. Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Proben ca. 10 min. thermostatisiert um sicher zu stellen, dass diese das thermische Gleichgewicht erreicht haben.

Tabelle 7-5: Dynamische Viskositäten η und Brechungsindices n_D von wasserfreiem Glycerin in Abhängigkeit von der Temperatur.

T/ °C	n_D ^[a]	η / cP ^[b]	T/ °C	n_D ^[a]	η / cP ^[b]
0	1,48027	12070	40	1,47145	284
5	1,47850	6772	50	1,47047	142
10	1,47688	3900	60	1,46966	81,3
15	1,47565	2322	70	1,46893	50,6
20	1,47442	1412	80	1,46819	31,9
25	1,47356	919	90	1,46741	21,3
30	1,47272	612	100	1,46654	14,8

^[a]Brechungsindex in Abhängigkeit von der Temperatur. ^[396] ^[b]Dynamische Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur. ^[396]

Konzentrationsänderungen, die sich durch die thermische Ausdehnung des Lösungsmittels ergeben, wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die gemessenen Quantenausbeuten befinden sich in Tabellen 7-8 bis 7-12 (Kapitel 7.3.4).

Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie in Wasser-Glycerin-Mischungen

Glycerin-Wasser-Mischungen verschiedener Zusammensetzung bieten die Möglichkeit einen großen Bereich unterschiedlicher Viskositäten (von 1,005 cP bis 1499 cP bei 20 °C) zu untersuchen.^[396] Zur Herstellung dieser Mischungen wurden die entsprechenden Mengen entionisiertes Wasser (*Millipore* Qualität) und wasserfreies hochreines Glycerin (*spectrophotometric grade, Sigma-Aldrich*) eingewogen und ausgiebig geschüttelt.

Tabelle 7-6: Brechungsindices n_D^{20} , dynamische Viskositäten η_{20} und Dichten d_{20} der verwendeten Glycerin-Wasser Mischungen.

Gew-% Glycerin	n_D^{20} ^[a]	η_{20} / cP ^[b]	d_{20} / g mL ⁻¹ ^[c]
0	1,3330	1,005	0,9982
20	1,3575	1,769	1,0469
40	1,3841	3,750	1,0993
60	1,4130	10,96	1,1538
70	1,4279	22,94	1,1813
80	1,4429	62,00	1,2085
85	1,4509	112,9	1,2218
91	1,4599	278,4	1,2377
96	1,4675	661,0	1,2508
99	1,4723	1197	1,2585
100	1,4740	1499	1,2611

^[a]Brechungsindex bei 20 °C. ^[396] ^[b]Dynamische Viskosität bei 20 °C. ^[396] ^[c]Dichte bei 20 °C. ^[396]

Die jeweiligen Stammlösungen der Farbstoffe wurden in Eppendorf-Cups portioniert, in Stickstoff ausgefroren und gefriergetrocknet. Anschließend wurden die entsprechenden Mengen der Glycerin-Wasser-Mischungen zu den Chromophoren eingewogen, so dass sich eine Endkonzentration von 10 μM ergab. Zum Lösen der Farbstoffe wurden die Eppendorf-Cups geschlossen in ein warmes (50- 60 $^{\circ}\text{C}$) Ultraschallbad gegeben und bis zu 30 min. mit Ultraschall behandelt. Nach Abkühlen auf RT wurden die Proben in Plastikküvetten überführt (Polymethylmethacrylat, *Carl Roth GmbH*) und wie in Kapitel 7.3.1 beschrieben bei 20 $^{\circ}\text{C}$ vermessen.

Tabelle 7-7: Fluoreszenzquantenausbeuten von **E** und **1-4** in verschiedenen Glycerin-Wasser-Mischungen ($c = 10 \mu\text{M}$) bei 20 $^{\circ}\text{C}$.

Gew-% Glycerin	Quantenausbeute $\Phi_F / 10^{-2}$				
	E	1	2	3	4
0	1,31	_ ^[a]	20,6	1,82	_ ^[b]
20	1,42	31,4	21,7	3,13	_ ^[b]
40	1,95	31,8	22,5	5,00	_ ^[b]
60	2,70	33,0	24,9	7,51	0,0395
70	3,94	34,2	28,0	9,69	0,0774
80	5,93	34,6	30,6	11,4	0,182
85	6,01	35,0	31,4	11,6	0,236
91	_ ^[a]	35,1	33,2	12,4	0,556
96	7,98	34,8	33,5	12,5	1,19
99	8,90	34,3	35,9	12,8	1,65
100	9,16	34,1	34,0	11,6	1,58

^[a]Aufgrund eines Messfehlers nicht bestimmt. ^[b]Zu geringe Fluoreszenz.

7.3.4. Fluoreszenzlebenszeiten nach *Strickler-Berg*

Die natürliche Strahlungslebensdauer τ_0 und die zugehörige Rate k_r der untersuchten Chromophore **E** und **1-4** in Glycerin wurden mit Hilfe der *Strickler-Berg* Gleichung^[87] abgeschätzt (vgl. Kapitel 3.2.4 und 4.6.3):

$$k_r = \frac{1}{\tau_0} = 2,880 \cdot 10^{-9} \cdot n^2 \cdot \left\langle \tilde{\nu}_f^{-3} \right\rangle_{Av}^{-1} \cdot \frac{g_l}{g_u} \int \varepsilon(\tilde{\nu}) d \ln \tilde{\nu} \quad \text{Gleichung 7-2}$$

Dabei ist n der Brechungsindex des Mediums, g_l und g_u sind die Multiplizitäten des oberen (upper) und unteren (lower) Zustands und $\varepsilon(\tilde{\nu})$ der molare Extinktionskoeffizient in

Abhängigkeit von der Frequenz in Wellenzahlen (d. h. das Absorptionsspektrum). Der Ausdruck $\langle \tilde{\nu}^{-3} \rangle_{Av}^{-1}$ berechnet sich aus dem Fluoreszenzspektrum der Probe gemäß:

$$\langle \tilde{\nu}^{-3} \rangle_{Av}^{-1} = \frac{\int I(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}}{\int \tilde{\nu}^{-3} I(\tilde{\nu}) d\tilde{\nu}} \quad \text{Gleichung 7-3}$$

$\tilde{\nu}$ bezeichnet die Frequenz in Wellenzahlen und $I(\tilde{\nu})$ die spektrale Photonenanzahldichte. Bei τ_0 handelt es sich um die Lebensdauer des strahlenden Übergangs, die als temperaturunabhängig angenommen wird. Daher wurde zur weiteren Betrachtung der Mittelwert $\bar{\tau}_0$ aus den Ergebnissen aller gemessenen Temperaturen gebildet und die Standardabweichung $\sigma(\bar{\tau}_0)$ nach folgender Formel berechnet:

$$\sigma(\bar{\tau}_0) = \sqrt{\frac{1}{N-1} \cdot \sum_{i=1}^N ((\tau_0)_i - \bar{\tau}_0)^2} \quad \text{Gleichung 7-4}$$

Dabei stellt N die Anzahl der gemessenen Werte für jeden Chromophor dar, während es sich bei $(\tau_0)_i$ um die zu der jeweiligen Temperatur berechnete „natürliche“ Lebensdauer handelt. Unter Einbeziehung der Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F kann die Fluoreszenzlebensdauer τ und die Rate der strahlungslosen Prozesse (k_{nr}) folgendermaßen berechnet werden:

$$\tau = \bar{\tau}_0 \cdot \Phi_F \quad \text{Gleichung 7-5}$$

$$k_{nr} = \frac{1 - \Phi_F}{\bar{\tau}_0 \cdot \Phi_F} \quad \text{Gleichung 7-6}$$

Zur Fehlerbetrachtung wurden folgende Gleichungen herangezogen:

$$\sigma(\tau) = \sqrt{(\Phi_F \cdot \sigma(\bar{\tau}_0))^2 + (\bar{\tau}_0 \cdot \sigma(\Phi_F))^2} \quad \text{Gleichung 7-7}$$

$$\sigma(k_{nr}) = \sqrt{\left(-\frac{1}{\bar{\tau}_0 \Phi_F^2}\right)^2 \cdot \sigma(\Phi_F)^2 + \left(\frac{\Phi_F - 1}{\Phi_F \bar{\tau}_0^2}\right)^2 \cdot \sigma(\bar{\tau}_0)^2} \quad \text{Gleichung 7-8}$$

Als Fehler $\sigma(\Phi_F)$ in der Bestimmung der Quantenausbeute wurden 10 % angenommen.

Tabelle 7-8: Viskosität η und gemessene Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F sowie Lebensdauer des strahlenden Übergangs τ_0 , Fluoreszenzlebenszeiten τ und Rate der strahlungslosen Prozesse k_{nr} mit den zugehörigen Fehlern ($\sigma(\Phi_F)$, $\sigma(k_{nr})$) berechnet nach *Strickler-Berg* für Ethidium.

T/K	$\eta^{[a]}/\text{cP}$	τ_0/ns	Φ_F	$\sigma(\Phi_F)$	τ/ns	$\sigma(\tau)/\text{ns}$	k_{nr}/s^{-1}	$\sigma(k_{nr})/\text{s}^{-1}$
273	12070	37,174	0,16	$1,61 \cdot 10^{-2}$	6,698	0,769	125208049	16521693
278	6772	37,221	0,14	$1,36 \cdot 10^{-2}$	5,666	0,651	152408274	19638803
283	3900	39,594	0,12	$1,15 \cdot 10^{-2}$	4,796	0,551	184419728	23309579
288	2322	43,902	0,11	$1,06 \cdot 10^{-2}$	4,430	0,509	201625819	25283286
293	1412	42,444	0,096	$0,96 \cdot 10^{-2}$	3,980	0,457	227151540	28211941
298	919	42,821	0,079	$0,79 \cdot 10^{-2}$	3,281	0,377	280722835	34359951
303	612	39,769	0,069	$0,69 \cdot 10^{-2}$	2,866	0,329	324780100	39417137
313	284	43,779	0,065	$0,65 \cdot 10^{-2}$	2,686	0,308	348196839	42105321
323	142	43,209	0,056	$0,56 \cdot 10^{-2}$	2,332	0,268	404694794	48591662
333	81,3	42,714	0,050	$0,50 \cdot 10^{-2}$	2,084	0,239	455755054	54454173
343	50,6	42,419	0,046	$0,46 \cdot 10^{-2}$	1,904	0,219	501199835	59672196
353	31,9	43,107	0,039	$0,39 \cdot 10^{-2}$	1,619	0,186	593771106	70301850
363	21,3	44,048	0,035	$0,35 \cdot 10^{-2}$	1,445	0,166	668021448	78828117
373	14,8	40,734	0,034	$0,34 \cdot 10^{-2}$	1,397	0,160	691745139	81552388
$\bar{\tau}_0 = 41,638$				$\sigma(\bar{\tau}_0) = 2,352$				

^[a]Dynamische Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur.^[396]

Tabelle 7-9: Viskosität η und gemessene Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F sowie Lebensdauer des strahlenden Übergangs τ_0 , Fluoreszenzlebenszeiten τ und Rate der strahlungslosen Prozesse k_{nr} mit den zugehörigen Fehlern ($\sigma(\Phi_F)$, $\sigma(k_{nr})$) berechnet nach *Strickler-Berg* für Chromophor **1**.

T/K	$\eta^{[a]}/\text{cP}$	τ_0/ns	Φ_F	$\sigma(\Phi_F)$	τ/ns	$\sigma(\tau)/\text{ns}$	k_{nr}/s^{-1}	$\sigma(k_{nr})/\text{s}^{-1}$
273	12070	31,932	0,44	$4,35 \cdot 10^{-2}$	14,551	1,537	38798380	6998097
278	6772	31,783	0,42	$4,21 \cdot 10^{-2}$	14,083	1,487	41083762	7237264
283	3900	32,655	0,39	$3,88 \cdot 10^{-2}$	12,979	1,371	47123279	7869956
288	2322	34,148	0,38	$3,77 \cdot 10^{-2}$	12,611	1,332	49371411	8105675
303	612	34,742	0,36	$3,62 \cdot 10^{-2}$	12,109	1,279	52657228	8450372
313	284	34,778	0,34	$3,42 \cdot 10^{-2}$	11,440	1,208	57486676	8957332
333	81,3	34,124	0,33	$3,27 \cdot 10^{-2}$	10,938	1,155	61496446	9378506
343	50,6	33,803	0,29	$2,91 \cdot 10^{-2}$	9,734	1,028	72806479	10567486
353	31,9	33,085	0,27	$2,65 \cdot 10^{-2}$	8,864	0,936	82885923	11628065
$\bar{\tau}_0 = 33,450$				$\sigma(\bar{\tau}_0) = 1,137$				

^[a]Dynamische Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur.^[396]

Tabelle 7-10: Viskosität η und gemessene Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F sowie Lebensdauer des strahlenden Übergangs τ_0 , Fluoreszenzlebenszeiten τ und Rate der strahlungslosen Prozesse k_{nr} mit den zugehörigen Fehlern ($\sigma(\Phi_F)$, $\sigma(k_{nr})$) berechnet nach *Strickler-Berg* für Chromophor 2.

T/K	$\eta^{[a]}/\text{cP}$	τ_0/ns	Φ_F	$\sigma(\Phi_F)$	τ/ns	$\sigma(\tau)/\text{ns}$	k_{nr}/s^{-1}	$\sigma(k_{nr})/\text{s}^{-1}$
273	12070	20,769	0,41	$4,07 \cdot 10^{-2}$	8,796	0,921	67378408	11558797
278	6772	21,118	0,39	$3,92 \cdot 10^{-2}$	8,472	0,887	71728830	12011100
288	2322	21,416	0,37	$3,68 \cdot 10^{-2}$	7,953	0,832	79427185	12812016
298	919	22,123	0,34	$3,42 \cdot 10^{-2}$	7,391	0,774	88986351	13807320
303	612	21,364	0,33	$3,31 \cdot 10^{-2}$	7,153	0,749	93482691	14275737
313	284	20,757	0,30	$2,96 \cdot 10^{-2}$	6,397	0,670	110012542	15998904
323	142	22,523	0,27	$2,67 \cdot 10^{-2}$	5,770	0,604	126991678	17770342
333	81,3	21,805	0,23	$2,33 \cdot 10^{-2}$	5,035	0,527	152280717	20410643
343	50,6	22,286	0,19	$1,90 \cdot 10^{-2}$	4,106	0,430	197225523	25106654
353	31,9	20,953	0,15	$1,54 \cdot 10^{-2}$	3,328	0,348	254156517	31058762
363	21,3	22,666	0,13	$1,29 \cdot 10^{-2}$	2,788	0,292	312386968	37149100
373	14,8	21,554	0,10	$1,03 \cdot 10^{-2}$	2,226	0,233	402932494	46621845
		$\bar{\tau}_0 = 21,611$	$\sigma(\bar{\tau}_0) = 0,669$					

^[a]Dynamische Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur.^[396]

Tabelle 7-11: Viskosität η und gemessene Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F sowie Lebensdauer des strahlenden Übergangs τ_0 , Fluoreszenzlebenszeiten τ und Rate der strahlungslosen Prozesse k_{nr} mit den zugehörigen Fehlern ($\sigma(\Phi_F)$, $\sigma(k_{nr})$) berechnet nach *Strickler-Berg* für Chromophor 3.

T/K	$\eta^{[a]}/\text{cP}$	τ_0/ns	Φ_F	$\sigma(\Phi_F)$	τ/ns	$\sigma(\tau)/\text{ns}$	k_{nr}/s^{-1}	$\sigma(k_{nr})/\text{s}^{-1}$
273	12070	39,676	0,23	$2,29 \cdot 10^{-2}$	9,086	1,108	83044156	12055643
278	6772	39,034	0,20	$1,95 \cdot 10^{-2}$	7,612	0,944	101824300	14285821
283	3900	38,615	0,17	$1,71 \cdot 10^{-2}$	6,603	0,828	119577260	16396990
288	2322	39,215	0,16	$1,61 \cdot 10^{-2}$	6,314	0,779	128536440	17463165
293	1412	38,746	0,15	$1,48 \cdot 10^{-2}$	5,734	0,716	141993370	19065305
298	919	39,129	0,13	$1,31 \cdot 10^{-2}$	5,126	0,634	163620860	21641567
303	612	36,990	0,12	$1,23 \cdot 10^{-2}$	4,550	0,595	175867120	23100903
313	284	41,025	0,12	$1,20 \cdot 10^{-2}$	4,923	0,581	180880440	23698414
323	142	40,451	0,13	$1,28 \cdot 10^{-2}$	5,178	0,620	168033820	22167401
333	81,3	47,797	0,11	$1,06 \cdot 10^{-2}$	5,066	0,513	208028020	26934754
343	50,6	40,412	0,12	$1,16 \cdot 10^{-2}$	4,688	0,561	187968230	24543252
353	31,9	40,697	0,10	$1,01 \cdot 10^{-2}$	4,110	0,489	219547500	28308343
363	21,3	43,381	0,10	$1,02 \cdot 10^{-2}$	4,425	0,494	217153260	28022839
373	14,8	42,426	0,088	$0,88 \cdot 10^{-2}$	3,712	0,424	257226080	32802115
		$\bar{\tau}_0 = 40,542$	$\sigma(\bar{\tau}_0) = 2,644$					

^[a]Dynamische Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur.^[396]

Tabelle 7-12: Viskosität η und gemessene Fluoreszenzquantenausbeute Φ_F sowie Lebensdauer des strahlenden Übergangs τ_0 , Fluoreszenzlebenszeiten τ und Rate der strahlungslosen Prozesse k_{nr} mit den zugehörigen Fehlern ($\sigma(\Phi_F)$, $\sigma(k_{nr})$) berechnet nach *Strickler-Berg* für Chromophor 4.

T/K	$\eta^{[a]}/\text{cP}$	τ_0/ns	Φ_F	$\sigma(\Phi_F)$	τ/ns	$\sigma(\tau)/\text{ns}$	k_{nr}/s^{-1}	$\sigma(k_{nr})/\text{s}^{-1}$
273	12070	24,584	0,12	$1,18 \cdot 10^{-2}$	3,016	0,336	292473580	36152977
278	6772	24,053	0,081	$0,81 \cdot 10^{-2}$	2,075	0,231	442756577	52891533
283	3900	24,285	0,057	$0,57 \cdot 10^{-2}$	1,464	0,163	643752530	75287615
288	2322	24,914	0,042	$0,42 \cdot 10^{-2}$	1,068	0,119	896974194	103508156
293	1412	24,742	0,026	$0,26 \cdot 10^{-2}$	0,664	0,074	1465836977	166912310
298	919	24,132	0,016	$0,16 \cdot 10^{-2}$	0,419	0,047	2346792740	265106817
303	612	25,541	0,013	$0,13 \cdot 10^{-2}$	0,342	0,038	2880954350	324647373
313	284	26,465	0,0070	$0,07 \cdot 10^{-2}$	0,179	0,020	5542770807	621350857
323	142	27,553	0,0044	$0,04 \cdot 10^{-2}$	0,113	0,013	8833686863	988179724
333	81,3	27,978	0,0030	$0,03 \cdot 10^{-2}$	0,076	0,008	13180167665	1472670012
343	50,6	26,928	0,0028	$0,03 \cdot 10^{-2}$	0,072	0,008	13836444810	1545823452
353	31,9	25,785	0,0028	$0,03 \cdot 10^{-2}$	0,072	0,008	13935556052	1556871115
363	21,3	25,488	0,0022	$0,02 \cdot 10^{-2}$	0,055	0,006	18076203510	2018417980
373	14,8	25,339	0,0018	$0,02 \cdot 10^{-2}$	0,046	0,005	21579168383	2408884143
$\bar{\tau}_0 = 25,556$			$\sigma(\bar{\tau}_0) = 1,259$					

^[a]Dynamische Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur.^[396]

7.4. Synthese und Charakterisierung von Oligonukleotiden

7.4.1. Verwendete Oligonukleotidsequenzen

Unmodifizierter Duplex für Titrationsexperimente

DNA1 3' CGT – CAG – ATC – TAG – TGA – CT 5'
 5' GCA – GTC – TAG – ATC – ACT – GA 3'

Ladungstransferduplexe mit Ethidium, 5-Nitroindol und Referenzduplexe

DNA2 3' CAG – TCA – **Et****T****Ni** – ACG – TAC – GT 5' **Et** = Ethidium
 5' GTC – AGT – C A C – TGC – ATG – CA 3' **Ni** = 5-Nitroindol

DNA3 3' CAG – TCA – **Et****T****G** – ACG – TAC – GT 5'
 5' GTC – AGT – C A C – TGC – ATG – CA 3'

DNA4 3' CAG – TCA – **Et****T****C** – **Ni****A****C** – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – CAG – C T G – CAT – GC 3'

DNA5 3' CAG – TCA – **Et****T****C** – **G****A****C** – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – CAG – CTG – CAT – GC 3'

DNA6 3' CAG – TCA – **Et****T****T** – **Ni****A****C** – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – C A A – C T G – CAT – GC 3'

DNA7 3' CAG – TCA – **Et****T****T** – **G****A****C** – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – C A A – CTG – CAT – GC 3'

DNA8 3' CAG – TCA – **Et****T****C** – **T****Ni****A** – CGT – AC 5'
 5' GTC – AGT – CAG – A C T – GCA – TG 3'

DNA9 3' CAG – TCA – **Et****T****C** – TGA – CGT – AC 5'
 5' GTC – AGT – CAG – ACT – GCA – TG 3'

DETEQ-Duplexe mit Ethidium und 5-Nitroindol

DNA2	3' CAG – TCA – Et T Ni – ACG – TAC – GT 5'	Et = Ethidium
	5' GTC – AGT – C A C – TGC – ATG – CA 3'	Ni = 5-Nitroindol
DNA2a	3' CAG – TCA – Et T Ni – ACG – TAC – GT 5'	
	5' GTC – AGT – C T C – TGC – ATG – CA 3'	
DNA2b	3' CAG – TCA – Et T Ni – ACG – TAC – GT 5'	
	5' GTC – AGT – C G C – TGC – ATG – CA 3'	
DNA2c	3' CAG – TCA – Et T Ni – ACG – TAC – GT 5'	
	5' GTC – AGT – C C C – TGC – ATG – CA 3'	
DNA4	3' CAG – TCA – Et T C – Ni A C – GTA – CG 5'	
	5' GTC – AGT – CAG – C T G – CAT – GC 3'	
DNA4a	3' CAG – TCA – Et T C – Ni A C – GTA – CG 5'	
	5' GTC – AGT – C TG – C TG – CAT – GC 3'	
DNA4b	3' CAG – TCA – Et T C – Ni A C – GTA – CG 5'	
	5' GTC – AGT – CGG – C T G – CAT – GC 3'	
DNA4c	3' CAG – TCA – Et T C – Ni A C – GTA – CG 5'	
	5' GTC – AGT – CCG – C T G – CAT – GC 3'	
DNA4d	3' CAG – TCA – Et T C – Ni A C – GTA – CG 5'	
	5' GTC – AGT – CAA – C T G – CAT – GC 3'	
DNA4e	3' CAG – TCA – Et T C – Ni A C – GTA – CG 5'	
	5' GTC – AGT – CAT – C T G – CAT – GC 3'	
DNA4e	3' CAG – TCA – Et T C – Ni A C – GTA – CG 5'	
	5' GTC – AGT – CAC – C T G – CAT – GC 3'	
DNA6	3' CAG – TCA – Et T T – Ni A C – GTA – CG 5'	
	5' GTC – AGT – C AA – C T G – CAT – GC 3'	

DNA6a	3' CAG – TCA – Et TT – Ni AC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C TA – C T G – CAT – GC 3'
DNA6b	3' CAG – TCA – Et TT – Ni AC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C GA – C T G – CAT – GC 3'
DNA6c	3' CAG – TCA – Et TT – Ni AC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C CA – C T G – CAT – GC 3'
DNA6d	3' CAG – TCA – Et TT – Ni AC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C AT – C T G – CAT – GC 3'
DNA6e	3' CAG – TCA – Et TT – Ni AC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C AG – C T G – CAT – GC 3'
DNA6f	3' CAG – TCA – Et TT – Ni AC – GTA – CG 5' 5' GTC – AGT – C AC – C T G – CAT – GC 3'
DNA8	3' CAG – TCA – Et TC – TNi A – CGT – AC 5' 5' GTC – AGT – CAG – AC T – GCA – TG 3'
DNA8a	3' CAG – TCA – Et TC – TNi A – CGT – AC 5' 5' GTC – AGT – C TG – AC T – GCA – TG 3'
DNA8b	3' CAG – TCA – Et TC – TNi A – CGT – AC 5' 5' GTC – AGT – CGG – AC T – GCA – TG 3'
DNA8c	3' CAG – TCA – Et TC – TNi A – CGT – AC 5' 5' GTC – AGT – CCG – AC T – GCA – TG 3'
DNA8d	3' CAG – TCA – Et TC – TNi A – CGT – AC 5' 5' GTC – AGT – CAA – AC T – GCA – TG 3'
DNA8e	3' CAG – TCA – Et TC – TNi A – CGT – AC 5' 5' GTC – AGT – C AT – AC T – GCA – TG 3'
DNA8f	3' CAG – TCA – Et TC – TNi A – CGT – AC 5' 5' GTC – AGT – CAC – AC T – GCA – TG 3'

DNA8g	3' CAG – TCA – E tTC – T N iA – CGT – AC 5'
	5' GTC – AGT – CAG – T C T – GCA – TG 3'
DNA8h	3' CAG – TCA – E tTC – T N iA – CGT – AC 5'
	5' GTC – AGT – CAG – GC T – GCA – TG 3'
DNA8i	3' CAG – TCA – E tTC – T N iA – CGT – AC 5'
	5' GTC – AGT – CAG – CC T – GCA – TG 3'

Methylviologen-modifizierte Duplexe

DNA10	3' AGT – CAC – TT MV – TTC – TGA – CG 5'	MV = Methylviologen
	5' TCA – GTG – AA A – AAG – ACT – GC 3'	
DNA10a	3' AGT – CAC – TT MV – TTC – TGA – CG 5'	
	5' TCA – GTG – AA T – AAG – ACT – GC 3'	
DNA10b	3' AGT – CAC – TT MV – TTC – TGA – CG 5'	
	5' TCA – GTG – AA G – AAG – ACT – GC 3'	
DNA10c	3' AGT – CAC – TT MV – TTC – TGA – CG 5'	
	5' TCA – GTG – AA C – AAG – ACT – GC 3'	
DNA11	3' AGT – CAC – TA MV – ATC – TGA – CG 5'	
	5' TCA – GTG – AT A – TAG – ACT – GC 3'	
DNA12	3' AGT – CAC – TC MV – CTC – TGA – CG 5'	
	5' TCA – GTG – AG A – GAG – ACT – GC 3'	
DNA13	3' AGT – CAC – TG MV – GTC – TGA – CG 5'	
	5' TCA – GTG – AC A – CAG – ACT – GC 3'	
DNA13a	3' AGT – CAC – TG MV – GTC – TGA – CG 5'	
	5' TCA – GTG – AC T – CAG – ACT – GC 3'	
DNA13b	3' AGT – CAC – TG MV – GTC – TGA – CG 5'	
	5' TCA – GTG – AC G – CAG – ACT – GC 3'	

DNA13c 3' AGT – CAC – TG**MV** – GTC – TGA – CG 5'
 5' TCA – GTG – AC C – CAG – ACT – GC 3'

Unmodifizierte Referenzduplexe

DNA14 3' AGT – CAC – TTT – TTC – TGA –CG 5'
 5' TCA – GTG – AAA – AAG – ACT –GC 3'

DNA15 3' AGT – CAC – TAT – ATC – TGA –CG 5'
 5' TCA – GTG – ATA – TAG – ACT –GC 3'

DNA16 3' AGT – CAC – TCT – CTC – TGA –CG 5'
 5' TCA – GTG – AGA – GAG – ACT –GC 3'

DNA17 3' AGT – CAC – TGT – GTC – TGA –CG 5'
 5' TCA – GTG – ACA – CAG – ACT –GC 3'

Ladungstransferduplexe mit Ethidium, Methylviologen und Referenzduplexe

DNA18 3' CGT – CAG – **Et**GA – GAG – TGA – CT 5' **Et** = Ethidium
 5' GCA – G TC – TC**MV** – CT C – ACT – GA 3' **MV** = Methylviologen

DNA19 3' CAG – TCA – **Et**TG – A CG – TAC – GT 5'
 5' GTC – AGT – C AC – **MV**GC – ATG – CA 3'

DNA20 3' CAG – TCA – **Et**TT – G A C – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – C AA – **CMV**G – CAT – GC 3'

DNA18a 3' CGT – CAG – **Et**GA – GAG – TGA – CT 5'
 5' GCA – G TC – T **CT** – CT C – ACT – GA 3'

DNA19a 3' CAG – TCA – **Et**TG – ACG – TAC – GT 5'
 5' GTC – AGT – C AC – **TGC** – ATG – CA 3'

DNA20 3' CAG – TCA – **Et**TT – GAC – GTA – CG 5'
 5' GTC – AGT – C AA – **CTG** – CAT – GC 3'

7.4.2. Kupplungsprotokolle

Der Syntheseautomat fördert die Reagenzien aus ihren Reservoirs in Pulsen zu je 16 μL durch die Reaktionsgefäße. Die Kupplungsprotokolle bestehen aus Einzelschritten, die die geförderte Substanz, die Zahl der Pulse und die Zeitdauer des Schrittes festlegen. Eine Zeitdauer von 0 s bedeutet, dass der Einzelschritt schnellstmöglich durchlaufen wird. Kommerziell erhältliche Phosphoramidite der natürlichen Basen werden als 0,067 M Lösung in trockenem Acetonitril in den Syntheseautomaten eingebracht. Zur Synthese unmodifizierter Oligonukleotide wird das Standardprotokoll verwendet (Tabelle 7-13). Dieses Standardverfahren wird für die einzelnen Sonderbausteine nur im Bereich „\$ Coupling“ verändert.

Tabelle 7-13: Standardprotokoll zur Kupplung der natürlichen Phosphoramidite von A, G, C, T. Erläuterungen: Dblk: 3 % Dichloressigsäure in Dichlormethan, Wsh: Acetonitril, Act: 0,45 M Tetrazol in Acetonitril, Caps: Acetanhydrid in THF/Pyridin (Cap A) und N-Methylimidazol in THF/Pyridin (Cap B), Ox: Iod in Wasser/THF/Pyridin.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Deblocking				
144	Index Fract. Coll.	NA	1	0
0	Default	WAIT	0	1.5
141	Trityl Mon. On/Off	NA	1	1
16	Dblk	PULSE	10	0
16	Dblk	PULSE	50	49
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
141	Trityl Mon. On/Off	NA	0	1
38	Diverted Wsh A	PULSE	40	0
144	Index Fract. Coll.	NA	2	0
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	5	0
18	A + Act	PULSE	2	16
2	Act	PULSE	3	24
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0
\$ Capping				
12	Wsh A	PULSE	20	0
13	Caps	PULSE	8	0
12	Wsh A	PULSE	6	15
12	Wsh A	PULSE	14	0
\$ Oxidizing				
15	Ox	PULSE	15	0
12	Wsh A	PULSE	15	0
\$ Capping				
13	Caps	PULSE	7	0
12	Wsh A	PULSE	30	0

Das Kupplungsprotokoll des Ethidiumbausteins **38** zur Synthese der Oligonukleotide **ssDNA3**, **ssDNA5**, **ssDNA7**, **ssDNA9** und **ssDNA18** wurde in früheren Arbeiten in unserer

Arbeitsgruppe entwickelt.^[102, 409] Um eine ausreichende Kupplungseffizienz zu erreichen, wurde die Konzentration von **38** auf 0,2 M in MeCN erhöht und die Kupplungsdauer von 1,6 min. auf 61,6 min. verlängert. Ebenso wurde die Zahl der Pulse von sieben auf zwölf und die Anzahl der Kupplungszyklen auf zwei erhöht. Tabelle 7-14 zeigt das veränderte Kupplungsprotokoll. (Sonderbaustein an Position 5 im Syntheseautomaten).

Tabelle 7-14: Verändertes Protokoll zur Kupplung des Ethidiumbausteins **38** in den Oligonukleotiden **ssDNA3**, **ssDNA5**, **ssDNA7**, **ssDNA9** und **ssDNA18**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	7	0
22	5 + Act	PULSE	6	0
22	5 + Act	PULSE	2	500
2	Act	PULSE	3	300
22	5 + Act	PULSE	3	50
22	5 + Act	PULSE	1	500
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	30	0
2	Act	PULSE	7	0
22	5 + Act	PULSE	6	0
22	5 + Act	PULSE	2	500
2	Act	PULSE	3	300
22	5 + Act	PULSE	3	50
22	5 + Act	PULSE	1	500
2	Act	PULSE	3	300
1	Wsh	PULSE	7	200
1	Wsh	PULSE	15	0

Der kommerziell erhältliche Nitroindolbaustein wurde ebenso wie die natürlichen Basen als 0,067 M Lösung in den Syntheseautomaten eingebracht und nach dem Standardkupplungsprotokoll (Tabelle 7-13) in die Oligonukleotide **ssDNA2**, **ssDNA4**, **ssDNA6** und **ssDNA8** eingebaut.

Der Einbau des modifizierten Uridinbausteins **49** in die Oligonukleotide **ssDNA10**, **ssDNA11**, **ssDNA12** und **ssDNA13** erfolgte mit einer Konzentration von 0,1 M in MeCN nach einem leicht veränderten Kupplungsprotokoll. Aufgrund der geringen Unterschiede im Vergleich zum natürlichen Nukleosid Uridin wurden die Gesamtzahl der Pulse und die Gesamtkupplungszeit von 1,6 min beibehalten, lediglich die Verweildauer der einzelnen Pulse wurde im Vergleich zum Standardprotokoll leicht verändert (Tabelle 7-15). (Sonderbaustein an Position 6 im Syntheseautomaten).

Tabelle 7-15: Verändertes Protokoll zur Kupplung des modifizierten Uridinbausteins **49** in den Oligonukleotiden **ssDNA10**, **ssDNA11**, **ssDNA12** und **ssDNA13**.

Codierung	Funktion	Modus	Menge /Arg1	Zeit (s) /Arg2
\$ Coupling				
1	Wsh	PULSE	5	0
2	Act	PULSE	5	0
22	6 + Act	PULSE	6	0
22	6 + Act	PULSE	1	8
2	Act	PULSE	4	32
1	Wsh	PULSE	7	56
1	Wsh	PULSE	8	0

7.4.3. Aufarbeitung und Reinigung der Oligonukleotide

Nach erfolgter DNA-Synthese wurden die CPG-Säulen im Hochvakuum getrocknet und anschließend geöffnet. Das CPG-Granulat wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 700 µL konzentrierter Ammoniumhydroxid-Lösung (> 25 %, *trace select*, *Fluka*) versetzt. Alle unmodifizierten und 2'-O-propargyl-Uridin-modifizierten Oligonukleotide wurden bei 55 °C innerhalb von 10 h entschützt und von der festen Phase abgespalten. Bei den Strängen **ssDNA2-9** und **ssDNA18** mit Ethidium als Modifikation wurde die Abspaltdauer auf 5 h verkürzt.^[102, 103] Nach dem Abkühlen wurde das CPG über Zentrifugenfilter abgetrennt und zweimal mit 300 µL Wasser gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden anschließend in einem Vakuumkonzentrator *Christ Alpha RVC* (35 min., Heizung 30 min., 35 °C, 100 mbar) vom Ammoniak befreit. Die wässrigen Lösungen wurden in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert.

Zur Reinigung mittels *reversed-phase* HPLC wurden die gefriergetrockneten Proben in 300 μ L Wasser aufgenommen. Die Oligonukleotide **ssDNA10-13** mussten nach erfolgter postsynthetischer Modifikation mittels Klickchemie zunächst entsalzt werden (vgl. Kapitel 7.4.4), ehe sie durch *reversed-phase* HPLC getrennt werden konnten. Zur Analytik und präparativen Trennung der Oligonukleotide wurden folgende Bedingungen verwendet:

Tabelle 7-16: Übersicht über die verwendeten HPLC-Gradienten und -Säulen zur Oligonukleotidreinigung. Erläuterungen: A= 50 mM NH₄OAc-Puffer (pH 6,5), B= MeCN

Sequenzen	Modifikation	Säule	Gradient	Detektion
Unmod. ON	---	Supelcosil LC-318	0 – 15 % B (45 min.)	$\lambda_{\text{Abs}} = 260 \text{ nm}, 290 \text{ nm}$
ssDNA2,4,6,8	Et	Discovery [®] Bio	0 – 15 % B (45 min)	$\lambda_{\text{Abs}} = 260 \text{ nm}, 530 \text{ nm}$
ssDNA3,5,7,9	Et/ Ni	Wide Pore C5		Fluoreszenz-Detektion:
ssDNA18	Et			$\lambda_{\text{Ex}} = 530 \text{ nm}, \lambda_{\text{Em}} = 580 \text{ nm}$
ssDNA10-14	MV	Discovery [®] Bio Wide Pore C5	0 – 15 % B (45 min)	$\lambda_{\text{Abs}} = 260 \text{ nm}, 310 \text{ nm}$

Die aufgereinigten Fraktionen wurden in sterilen Kunststoffröhrchen (*Falcon-Tubes*, 15 mL) aufgefangen, in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert. Die verbleibende DNA wurde in 500 μ L entionisiertem Wasser aufgenommen und als Stammlösung zur Herstellung weiterer DNA-Lösungen verwendet.

7.4.4. Klickreaktion

Synthesevorschrift

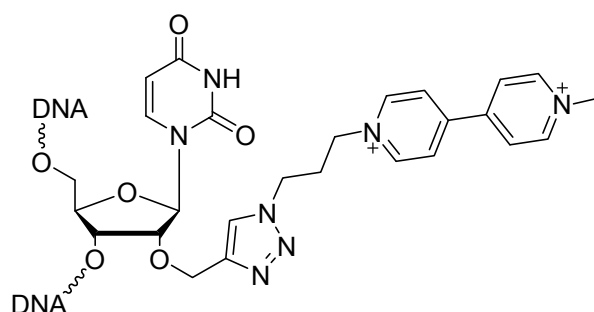


Abbildung 7-1: Methylviologen-modifizierte DNA.

Nach erfolgter Abspaltung von den CPG-Säulen werden die gefriergetrockneten DNA-Stränge mit je 25 μL (10 μmol) Natriumascorbat-Lösung (400 mM in Wasser), 34 μL (3,4 μmol) TBTA-Lösung (100 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1), 17 μL (0,17 μmol) Tetrakis(acetonitril)kupfer(I)-hexafluorophosphat-Lösung (10 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) und 114 μL (1,14 μmol) einer Lösung des Azids **42** (10 mM in DMSO/*t*BuOH 3:1) versetzt und 10 h bei RT geschüttelt. Anschließend wird das Lösungsmittel durch Gefriertrocknung entfernt, der Rückstand in 100 μL (0,15 mmol) Natriumacetat-Lösung (0,3 M in Wasser) und 1 mL EtOH aufgenommen und über Nacht bei $-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Nach Abzentrifugieren (15 min. bei 13000 rpm) wird der Überstand vorsichtig vom DNA-Pellet entfernt. Der Rückstand wird mit 1 mL EtOH (70 Vol-%) gewaschen, erneut abzentrifugiert (15 min. bei 13000 rpm) und der Überstand nochmals vorsichtig abpipettiert. Das DNA-Pellet wird anschließend im flüssigen Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert.

Entsalzen

Um die DNA-Stränge über RP-HPLC zu reinigen, ist es notwendig, die methylviologenmodifizierten Stränge zunächst von überschüssigen Kupfersalzen zu befreien. Dazu werden *illustra NAP-5*-Säulen der Firma *GE-Healthcare* verwendet. Zuerst müssen die Säulen mit 10 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers equilibriert werden. Anschließend wird der entsprechende DNA-Strang in max. 500 μL Wasser aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Das Oligonukleotid wird mit 1 mL eines 5 mM Ammoniumacetatpuffers eluiert und zur Verringerung des Probenvolumens in flüssigem Stickstoff ausgefroren und lyophilisiert.

7.4.5. Charakterisierung und Hybridisierung von Oligonukleotiden

Charakterisierung der Oligonukleotide durch ESI-MS.

ESI-Massenspektren von Oligonukleotiden wurden von der Betriebseinheit Zentrale Analytik, Massenspektrometrie der Universität Regensburg an einem *ThermoQuest Finnigan TSQ 7000* im negativen oder positiven Ionisierungsmodus aufgenommen.

Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA-Stammlösungen wurde mit Hilfe des *Lambert-Beerschen Gesetzes* über die optische Dichte bei $\lambda_{\text{Abs}} = 260\text{ nm}$ bestimmt.^[452] Der Extinktionskoeffizient

ε_{260} eines unmodifizierten DNA-Strangs in Wasser kann über folgende Formel berechnet werden:

$$\varepsilon_{260} = (A \cdot \varepsilon_A + C \cdot \varepsilon_C + G \cdot \varepsilon_G + T \cdot \varepsilon_T) \cdot 0,9 \quad \text{Gleichung 7-9}$$

Dabei steht A , C , G und T für die Anzahl der entsprechenden Nukleobase, ε beschreibt die Extinktionskoeffizienten der einzelnen DNA-Basen bei $\lambda_{\text{Abs}} = 260 \text{ nm}$. Der Faktor 0,9 berücksichtigt die Hypochromizität. Zur Konzentrationsbestimmung modifizierter Oligonukleotide muss der entsprechende Extinktionskoeffizient der Modifikation bei 260 nm addiert werden.

Tabelle 7-17: Molare Extinktionskoeffizienten der natürlichen und modifizierten Nukleoside.

natürliche Nukleoside	Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{260} [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$	modifizierte Nukleoside	Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{260} [\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}]$
A	15400	Ethidium	45200 ^[a]
C	7300	5-Nitroindol	18100 ^[b]
G	11700	Methylviologen	34100 ^[c]
T	8800		
U	10100		

^[a]Der Extinktionskoeffizient von Ethidium wurde der Literatur entnommen.^[453] ^[b]Der Extinktionskoeffizient von 5-Nitroindol wurde der Literatur entnommen.^[106] ^[c]Zusammengesetzt aus U und *N*-(3-Iodpropyl)-*N'*-methyl-4,4'-bipyridinium Iodid (experimentell bestimmt in Wasser: 24000 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

Hybridisierung

Der modifizierte Einzelstrang wurde zusammen mit 1,2 eq. des komplementären Gegenstrangs in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) und ggf. 250 mM NaCl für 10 min. auf 90 °C erhitzt und anschließend langsam auf RT abgekühlt.

Schmelztemperaturmessungen

Für die Schmelztemperaturmessungen wurden Duplexlösungen in 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7) und 250 mM NaCl frisch hybridisiert. In einem Cary 100 UV/Vis-Spektrometer wurden die Proben im Bereich zwischen 10 °C und 90 °C mit einer Rate von 0,7 °C erhitzt bzw. abgekühlt und dabei die Absorptionsänderung bei $\lambda_{\text{Abs}} = 260 \text{ nm}$ optisch verfolgt.

7.4.6. Charakterisierung der synthetisierten Oligonukleotide

7.4.6.1. Ladungstransfer-Oligonukleotide mit den Modifikationen Ethidium und Nitroindol

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der ESI-MS-Analytik, der molaren Extinktionskoeffizienten und der Fluoreszenzlebenszeiten der Ladungstransfer-Oligonukleotide, sowie der Schmelztemperaturen der Ladungstransfer- und Referenzduplexe. Die Abbildungen 7-2 bis 7-4 zeigen die Ergebnisse der stationären Fluoreszenzmessungen.

Tabelle 7-18: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der ethidiummodifizierten Oligonukleotide und der Ladungstransfer-Oligonukleotide mit Ethidium und Nitroindol.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/ mol]	gefundene Masse [g/ mol]	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
ssDNA2 (Ethidium, Nitroindol)	5369,5	1791,3 [$M^{+}-4H^{+}$] ³⁻ 1348,8 [$M^{+}-5H^{+}$] ⁴⁻	208300
ssDNA3 (Ethidium)	5358,4	1785,9 [$M^{+}-4H^{+}$] ³⁻ 1338,9 [$M^{+}-5H^{+}$] ⁴⁻	200700
ssDNA4 (Ethidium, Nitroindol)	5354,5	1784,2 [$M^{+}-4H^{+}$] ³⁻ 1338,0 [$M^{+}-5H^{+}$] ⁴⁻	206900
ssDNA5 (Ethidium)	5343,1	1780,8 [$M^{+}-4H^{+}$] ³⁻ 1335,4 [$M^{+}-5H^{+}$] ⁴⁻	199400
ssDNA6 (Ethidium, Nitroindol)	5369,5	1791,3 [$M^{+}-4H^{+}$] ³⁻ 1348,8 [$M^{+}-5H^{+}$] ⁴⁻	208300
ssDNA7 (Ethidium)	5358,4	1785,9 [$M^{+}-4H^{+}$] ³⁻ 1338,9 [$M^{+}-5H^{+}$] ⁴⁻	200700
ssDNA8 (Ethidium, Nitroindol)	5329,5	1775,9 [$M^{+}-4H^{+}$] ³⁻ 1331,7 [$M^{+}-5H^{+}$] ⁴⁻	204300
ssDNA9 (Ethidium)	5318,0	1772,4 [$M^{+}-4H^{+}$] ³⁻ 1329,1 [$M^{+}-5H^{+}$] ⁴⁻	196800

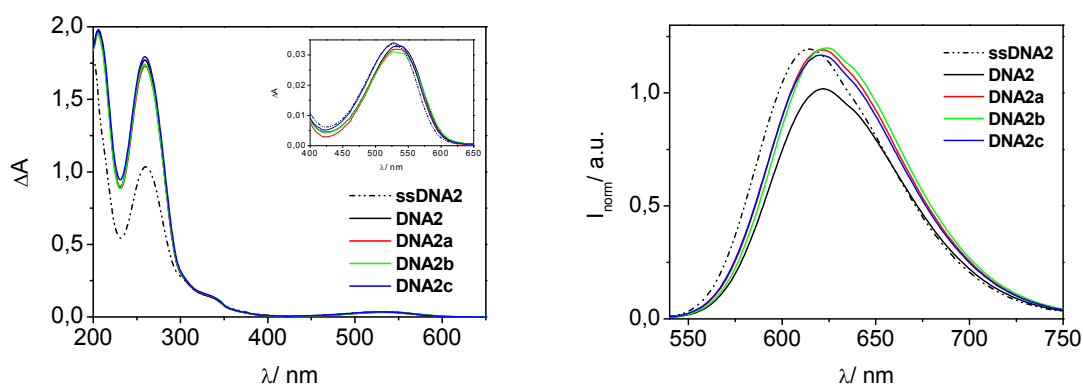


Abb. 7-2: UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **DNA2/DNA2a-c**, $\lambda_{\text{Ex}} = 530 \text{ nm}$; $5 \mu\text{M}$ Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20°C .

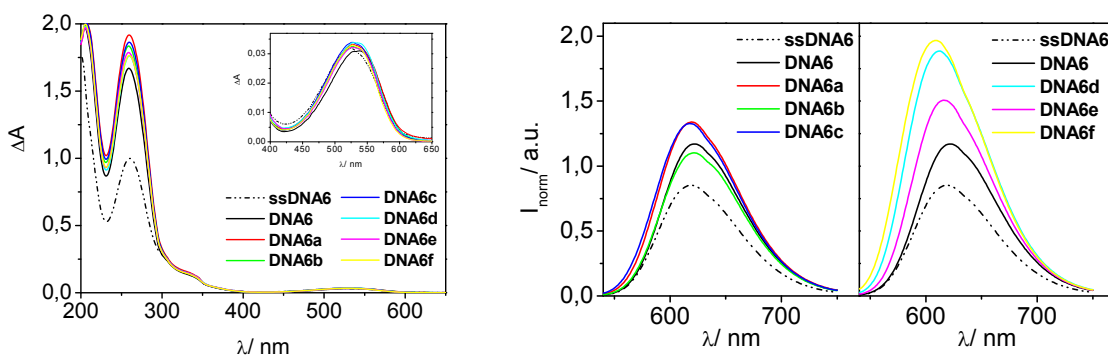


Abb. 7-3: UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **DNA6/DNA6a-f**, $\lambda_{\text{Ex}} = 530 \text{ nm}$; $5 \mu\text{M}$ Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20°C .

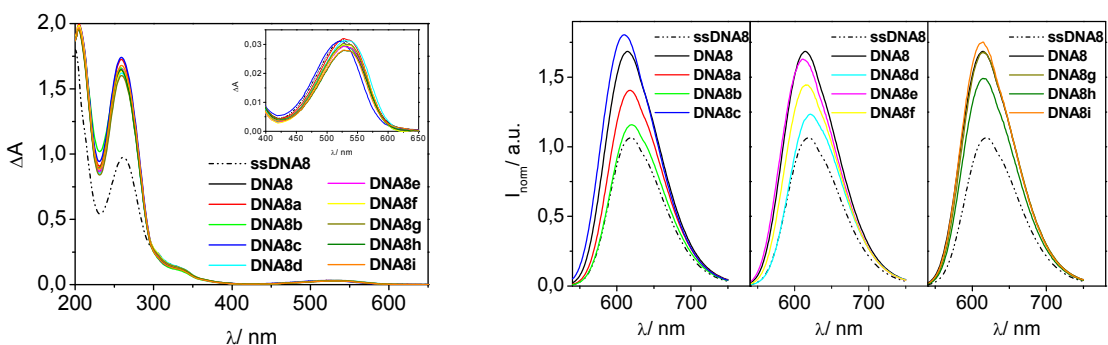


Abb. 7-4: UV/Vis-Absorptions- und Fluoreszenzspektren von **DNA8/DNA8a-i**, $\lambda_{\text{Ex}} = 530 \text{ nm}$; $5 \mu\text{M}$ Einzelstrang oder Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer, pH 7, 250 mM NaCl, 20°C .

Tabelle 7-19: Schmelztemperaturen von 2,5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i-Puffer (pH 7), 250 mM NaCl, 260 nm.

DNA-Duplex	T _{m1} [°C]	T _{m2} [°C]	T _m [°C]
	10 °C → 90 °C	90 °C → 10 °C	
DNA2	58,5	57,5	58,0
DNA2a	56,0	54,9	55,5
DNA2b	55,1	53,4	54,3
DNA2c	55,6	54,4	55,0
DNA3	67,0	66,0	66,5
DNA6	56,0	55,1	55,6
DNA6a	52,1	50,9	51,5
DNA6b	50,0	49,5	49,8
DNA6c	49,7	48,2	48,9
DNA6d	51,1	50,4	50,8
DNA6e	49,7	48,8	49,3
DNA6f	50,7	48,9	49,8
DNA7	64,3	63,0	63,7
DNA8	54,3	53,7	54,0
DNA8a	48,1	47,8	48,0
DNA8b	49,0	47,5	48,3
DNA8c	47,6	46,4	47,0
DNA8d	41,1	40,4	40,8
DNA8e	39,1	37,9	38,5
DNA8f	35,5	34,5	35,0
DNA8g	50,1	48,9	49,5
DNA8h	48,2	48,1	48,2
DNA8i	47,7	46,8	47,3
DNA9	63,2	61,8	62,5

Tabelle 7-20: Fluoreszenzlebenszeiten ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$) von 5,0 μM Duplex in 10 mM NaP_i -Puffer(pH 7), 250 mM NaCl.

DNA-Duplex	τ_1 [ns]	Verteilung	τ_2 [ns]	Verteilung	τ [ns]
ssDNA3	$1,23 \pm 0,09$	0,166	$20,9 \pm 0,07$	0,834	17,6
DNA3	$2,27 \pm 0,05$	0,184	$20,2 \pm 0,05$	0,816	16,9
ssDNA2	$0,804 \pm 0,01$	0,296	$13,9 \pm 0,02$	0,704	10,0
DNA2	$0,818 \pm 0,01$	0,226	$12,4 \pm 0,01$	0,774	9,81
DNA2a	$0,768 \pm 0,01$	0,205	$11,8 \pm 0,02$	0,795	9,51
DNA2b	$0,914 \pm 0,02$	0,192	$13,4 \pm 0,02$	0,808	11,0
DNA2c	$0,173 \pm 0,01$	0,268	$11,2 \pm 0,02$	0,732	8,27
ssDNA7	$0,698 \pm 0,01$	0,127	$12,4 \pm 0,01$	0,873	10,9
DNA7	$0,707 \pm 0,02$	0,250	$17,4 \pm 0,05$	0,750	13,3
ssDNA6	$1,93 \pm 0,02$	0,299	$11,6 \pm 0,02$	0,701	8,74
DNA6	$1,21 \pm 0,02$	0,204	$13,6 \pm 0,02$	0,796	11,1
DNA6a	$0,600 \pm 0,01$	0,142	$12,7 \pm 0,01$	0,858	11,0
DNA6b	$1,14 \pm 0,02$	0,224	$12,5 \pm 0,02$	0,776	9,97
DNA6c	$0,55 \pm 0,01$	0,228	$13,4 \pm 0,02$	0,772	10,5
DNA6d	$1,17 \pm 0,03$	0,166	$18,4 \pm 0,04$	0,834	15,5
DNA6e	$1,32 \pm 0,02$	0,166	$15,1 \pm 0,02$	0,834	12,8
DNA6f	$2,04 \pm 0,03$	0,133	$20,2 \pm 0,05$	0,867	17,8
ssDNA9	$0,643 \pm 0,01$	0,170	$11,7 \pm 0,02$	0,830	9,86
DNA9	$0,790 \pm 0,02$	0,131	$18,9 \pm 0,05$	0,869	16,5
ssDNA8	$1,76 \pm 0,02$	0,297	$12,4 \pm 0,02$	0,703	9,25
DNA8	$1,07 \pm 0,02$	0,148	$18,2 \pm 0,03$	0,852	15,7
DNA8a	$1,83 \pm 0,03$	0,235	$14,4 \pm 0,03$	0,765	11,4
DNA8b	$0,778 \pm 0,01$	0,151	$11,1 \pm 0,01$	0,849	9,50
DNA8c	$1,17 \pm 0,03$	0,190	$18,7 \pm 0,06$	0,810	15,4
DNA8d	$0,959 \pm 0,01$	0,198	$12,5 \pm 0,02$	0,802	10,2
DNA8e	$1,30 \pm 0,02$	0,177	$17,9 \pm 0,03$	0,823	15,0
DNA8f	$1,99 \pm 0,04$	0,317	$17,1 \pm 0,05$	0,683	12,3
DNA8g	$1,58 \pm 0,02$	0,178	$18,0 \pm 0,03$	0,822	15,1
DNA8h	$1,33 \pm 0,02$	0,146	$16,8 \pm 0,02$	0,854	14,5
DNA8i	$0,794 \pm 0,02$	0,138	$17,7 \pm 0,02$	0,862	15,4

7.4.6.2. Methylviologenmodifizierte Oligonukleotide

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der ESI-MS-Analytik und der molaren Extinktionskoeffizienten der Oligonukleotide, sowie der Schmelztemperaturen der methylviologenmodifizierten Duplexe und der Referenzduplexe.

Tabelle 7-21: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der methylviologenmodifizierten Oligonukleotide.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/ mol]	gefundene Masse [g/ mol]	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [M ⁻¹ cm ⁻¹]
ssDNA10 (Methylviologen)	5444,4	1813,9 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1360,3 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	191200
ssDNA11 (Methylviologen)	5462,4	1820,0 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1364,7 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	203100
ssDNA12 (Methylviologen)	5414,4	1804,0 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1352,6 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	188500
ssDNA13 (Methylviologen)	5494,4	1830,8 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1372,8 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	196400

Tabelle 7-22: Schmelztemperaturen von 2,5 μ M Duplex in 10 mM NaP_i-Puffer(pH 7), 250 mM NaCl, 260 nm.

DNA-Duplex	T _{m1} [°C]	T _{m2} [°C]	T _m [°C]
	10 °C → 90 °C	90 °C → 10 °C	
DNA10	62,5	60,9	61,7
DNA10a	55,1	52,9	54,0
DNA10b	52,9	51,7	52,3
DNA10c	52,7	51,3	52,0
DNA11	61,9	60,2	61,1
DNA12	65,6	63,9	64,8
DNA13	68,1	66,4	67,3
DNA13a	61,0	60,4	60,7
DNA13b	62,0	61,9	62,0
DNA13c	60,6	58,9	59,8
DNA14	63,0	61,5	62,3
DNA15	62,0	60,0	61,0
DNA16	67,0	65,0	66,0
DNA17	68,0	67,0	67,5

7.4.6.3. Ladungstransfer-Oligonukleotide mit den Modifikationen Ethidium und Methylviologen

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Zusammenfassung der ESI-MS-Analytik und der molaren Extinktionskoeffizienten der Ladungstransfer-Oligonukleotide, sowie der Schmelztemperaturen der Ladungstransfer- und Referenzduplexe.

Tabelle 7-23: ESI-Massen und Extinktionskoeffizienten der ethidiummodifizierten Oligonukleotide und der methylviologenmodifizierten Gegenstränge.

DNA-Strang (Modifikation)	errechnete Masse [g/ mol]	gefundene Masse [g/ mol]	Extinktionskoeffizient ϵ_{260} [M ⁻¹ cm ⁻¹]
ssDNA18 (Ethidium)	5423,4	1807,8 [M ⁺ -4H ⁺] ³⁻ 1355,6 [M ⁺ -5H ⁺] ⁴⁻	207300
ssDNA12 (Methylviologen)	5414,4	1804,0 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1352,6 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	188500
ssDNA3 (Ethidium)	5358,4	1785,9 [M ⁺ -4H ⁺] ³⁻ 1338,9 [M ⁺ -5H ⁺] ⁴⁻	200700
ssDNA7 (Ethidium)	5358,4	1785,9 [M ⁺ -4H ⁺] ³⁻ 1338,9 [M ⁺ -5H ⁺] ⁴⁻	200700
ssDNA19 (Methylviologen)	5463,4	1820,9 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1365,5 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	154200
ssDNA20 (Methylviologen)	5463,4	1820,9 [M ²⁺ -5H ⁺] ³⁻ 1365,5 [M ²⁺ -6H ⁺] ⁴⁻	154200

Tabelle 7-24: Schmelztemperaturen von 2,5 µM Duplex in 10 mM NaP_i-Puffer(pH 7), 250 mM NaCl, 260 nm.

DNA-Duplex	T _{m1} [°C]	T _{m2} [°C]	T _m [°C]
	10 °C → 90 °C	90 °C → 10 °C	
DNA18	66,0	64,8	65,4
DNA18a	67,1	65,9	66,5
DNA19	64,8	63,7	64,3
DNA19a	67,0	66,0	66,5
DNA20	63,4	61,6	62,5
DNA20a	64,3	63,0	63,7

7.5. Quantenmechanische Berechnungen

Die quantenmechanischen Berechnungen wurden in der Arbeitsgruppe *Prof. Dr. W. Rettig (Humboldt Universität, Berlin)* von Dr. Vladimir Kharlanov ausgeführt. Die Optimierung der Grundzustandsgeometrie für **E**, **3** und **4** wurde mit Hilfe der *AM1*-Methode erzielt, Charakteristika des angeregten Zustands (Übergangsenergien ΔE_{01} und Energieunterschiede, sowie Oszillator-stärke f) wurden mit *ZINDO/s* basierend auf dem durch *AM-1* optimierten Grundzustand berechnet. Für Verbindung **4** wurden zusätzlich *DFT*-Berechnungen durchgeführt. Die Energien wurden dabei mittels *B3LYP* (Grundzustände) und *TDB3LYP* (angeregte Zustände) mit dem Basissatz *6-31+G(2df,2p)* für die optimierte Gleichgewichts- sowie die orthogonale Konformation berechnet.

7.6. Daten zur Kristallstruktur

7.6.1. Kristallstruktur von 5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (**1**)

5-Ethyl-6-methyl-phenanthridiniumiodid (**1**) kristallisierte aus einer MeCN-Et₂O-Mischung bei 0 °C in Form gelber Nadeln.

Tabelle 7-25: Daten der Kristallstrukturuntersuchung von Verbindung **1**.

Summenformel	$\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{I}$
Molekulargewicht [g/mol]	390,25
Kristalldimensionen [mm]	0,15 x 0,06 x 0,05
Messtemperatur [K]	123
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	$P 2_1/n$
Zelldimensionen	$a = 6,95160(10) \text{ \AA}$ $b = 12,4139(2) \text{ \AA}$ $c = 19,3764(3) \text{ \AA}$ $\beta = 94,1840(10)^\circ$ $V = 1667,66(4) \text{ \AA}^3$
Zahl der Formeleinheiten pro Elementarzelle	4
Röntgenographische Dichte [g/cm ³]	1,554
$\mu(\text{Cu-K}_\alpha)$ [mm ⁻¹]	15,033
Messbereich θ [°]	4,23 – 62,24
Gemessene Reflexe	6935
Unabhängige Reflexe	2564
Unabhängige Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$	1941
Parameter	190
R_1 / wR_2 ($I > 2\sigma(I)$)	0,0285 / 0,0659
R_1 / wR_2 (alle Reflexe)	0,0416 / 0,0694
Max. Restelektronendichte [$\text{e}^- \text{ \AA}^{-3}$]	0,984 / -0,676

Tabelle 7-26: Lageparameter und Schwingungstensoren U_{eq} bzw. U_{iso} in Verbindung **1**.

Atom	x/a [$\cdot 10^{-4}$]	y/b [$\cdot 10^{-4}$]	z/c [$\cdot 10^{-4}$]	U_{eq} bzw. U_{iso} [$\text{\AA}^2 \cdot 10^{-2}$]
N(1)	3157(5)	196(3)	-1325(2)	19(1)
C(1)	3150(5)	1202(3)	-977(2)	21(1)
C(2)	3419(6)	2163(3)	-1343(2)	25(2)
C(3)	3436(6)	3125(4)	-994(3)	32(2)
C(4)	3207(6)	3162(4)	-282(3)	31(2)
C(5)	2921(6)	2229(3)	67(2)	23(1)
C(6)	2864(5)	1221(3)	-267(2)	19(1)
C(7)	2525(5)	229(3)	87(2)	19(1)
C(8)	2470(5)	-747(3)	-291(2)	18(1)
C(9)	2811(5)	-731(3)	-1013(2)	20(1)
C(10)	2798(6)	-1750(3)	-1428(2)	25(1)
C(11)	3584(6)	214(4)	-2074(2)	26(1)
C(12)	1768(7)	417(4)	-2542(2)	31(2)
C(13)	2210(6)	188(3)	794(2)	23(1)
C(14)	1886(6)	-765(4)	1115(2)	23(2)
C(15)	1827(6)	-1726(4)	737(2)	25(1)
C(16)	2114(6)	-1725(3)	55(2)	25(1)
N(2)	-1414(8)	4294(3)	659(3)	47(2)
C(17)	1852(10)	5013(4)	1186(3)	53(2)
C(18)	20(10)	4611(4)	891(3)	41(2)
I(1)	-2340(1)	-2281(1)	-2314(1)	26(1)

Tabelle 7-27: Koeffizienten U_{ij} der Schwingungstensoren in Verbindung **1**.

Atom	$U_{11} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{22} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{33} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{23} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{13} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{12} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$
N(1)	19(2)	26(2)	13(2)	2(2)	2(2)	0(2)
C(1)	13(2)	23(2)	26(3)	-2(2)	2(2)	2(2)
C(2)	21(2)	31(3)	23(3)	8(2)	4(2)	3(2)
C(3)	33(3)	22(2)	41(3)	7(2)	9(2)	1(2)
C(4)	37(3)	21(2)	35(3)	-7(2)	7(2)	2(2)
C(5)	23(2)	24(2)	23(3)	-1(2)	1(2)	5(2)
C(6)	11(2)	25(2)	19(3)	-3(2)	-1(2)	1(2)
C(7)	10(2)	25(2)	23(3)	0(2)	-1(2)	0(2)
C(8)	14(2)	23(2)	18(3)	0(2)	0(2)	1(2)
C(9)	11(2)	25(2)	25(3)	1(2)	2(2)	2(2)
C(10)	32(2)	23(2)	21(3)	-3(2)	5(2)	-1(2)
C(11)	28(3)	31(2)	20(2)	0(2)	9(2)	3(2)
C(12)	38(3)	41(3)	13(3)	1(2)	1(2)	3(2)
C(13)	18(2)	30(2)	21(3)	-5(2)	2(2)	3(2)
C(14)	16(2)	36(3)	18(3)	6(2)	1(2)	1(2)
C(15)	20(2)	26(2)	29(3)	9(2)	0(2)	-1(2)
C(16)	17(2)	22(2)	35(3)	4(2)	1(2)	1(2)
N(2)	70(3)	26(2)	46(3)	3(2)	15(3)	0(2)
C(17)	91(5)	30(3)	37(3)	-6(2)	-2(3)	-3(3)
C(18)	80(5)	17(3)	26(3)	-3(2)	14(3)	-1(3)
I(1)	29(1)	28(1)	22(1)	-6(1)	3(1)	0(1)

7.6.2. Kristallstruktur von 3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4-*N,N*-diethylamino)-phenyl-phenanthridiniumtrifluoracetat (**4**)

3,8-Diamino-5-ethyl-6-(4-*N,N*-diethylamino)-phenyl-phenanthridiniumtrifluoracetat (**4**) kristallisierte aus einer THF-Heptan-Mischung bei 0 °C in Form dunkelroter Plättchen.

Tabelle 7-28: Daten der Kristallstrukturuntersuchung von Verbindung 4.

Summenformel	$C_{35}H_{45}F_3N_4O_4$
Molekulargewicht [g/mol]	642,75
Kristalldimensionen [mm]	0,17 x 0,14 x 0,05
Messtemperatur [K]	123
Kristallsystem	monoklin
Raumgruppe	$I 2/a$
Zelldimensionen	$a = 15,3780(3) \text{ \AA}$ $b = 16,6844(3) \text{ \AA}$ $c = 25,8802(4) \text{ \AA}$ $\beta = 94,133(2)^\circ$ $V = 6622,9(2) \text{ \AA}^3$
Zahl der Formeleinheiten pro Elementarzelle	8
Röntgenographische Dichte [g/cm ³]	1,289
$\mu(\text{Cu-K}\alpha)$ [mm ⁻¹]	0,795
Messbereich θ [°]	3,15 – 54,29
Gemessene Reflexe	11517
Unabhängige Reflexe	3967
Unabhängige Reflexe mit $I > 2\sigma(I)$	2438
Parameter	427
R_1 / wR_2 ($I > 2\sigma(I)$)	0,0614 / 0,1559
R_1 / wR_2 (alle Reflexe)	0,1055 / 0,1867
Max. Restelektronendichte [$e^- \text{ \AA}^{-3}$]	0,684 / -0,265

Tabelle 7-29: Lageparameter und Schwingungstensoren $U_{eq.}$ bzw. $U_{iso.}$ in Verbindung 4.

Atom	$x/a [\cdot 10^{-4}]$	$y/b [\cdot 10^{-4}]$	$z/c [\cdot 10^{-4}]$	$U_{eq.}$ bzw. $U_{iso.} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-2}]$
N(1)	8981(3)	838(3)	3003(2)	53(1)
N(2)	3465(3)	1017(3)	4698(2)	61(2)
N(3)	5066(2)	1120(2)	3164(1)	39(1)
N(4)	5526(3)	1412(2)	733(1)	66(2)
C(1)	6628(3)	996(2)	3214(2)	41(2)
C(2)	7419(3)	995(2)	2964(2)	42(2)
C(3)	8203(3)	872(3)	3231(2)	45(2)
C(4)	8207(3)	732(3)	3777(2)	48(2)
C(5)	7455(3)	731(3)	4023(2)	46(2)
C(6)	6638(3)	878(2)	3758(2)	39(1)
C(7)	5841(3)	911(2)	4001(2)	38(1)
C(8)	5784(3)	843(2)	4542(2)	42(2)
C(9)	5028(3)	904(2)	4772(2)	41(2)

C(10)	4232(3)	1003(3)	4469(2)	47(2)
C(11)	4259(3)	1073(3)	3940(2)	44(1)
C(12)	5045(3)	1036(2)	3704(1)	37(1)
C(13)	5819(3)	1111(2)	2928(2)	39(1)
C(14)	4225(3)	1220(3)	2856(2)	49(2)
C(15)	3889(3)	2074(3)	2870(2)	58(2)
C(16)	5784(3)	1205(3)	2353(2)	39(2)
C(17)	5843(3)	542(3)	2041(2)	45(2)
C(18)	5787(3)	603(3)	1509(2)	51(2)
C(19)	5661(3)	1348(3)	1263(2)	45(2)
C(20)	5647(3)	2022(3)	1585(2)	45(2)
C(21)	5709(3)	1946(3)	2119(2)	45(2)
C(22)	5516(4)	710(3)	405(2)	75(2)
C(23)	6399(4)	408(4)	289(2)	88(3)
C(24)	5502(3)	2180(3)	476(2)	54(2)
C(25)	6389(4)	2523(4)	446(2)	93(3)
O(1)	1704(3)	1208(2)	1234(2)	90(2)
C(26)	1974(6)	1760(4)	853(3)	107(3)
C(27)	2917(5)	1538(5)	766(3)	108(3)
C(28)	3210(5)	1037(5)	1230(3)	110(3)
C(29)	2449(4)	1046(4)	1562(3)	91(3)
O(2)	8945(2)	1638(2)	1923(1)	67(1)
C(30)	8173(4)	1770(3)	1588(2)	69(2)
C(31)	8478(4)	1832(4)	1053(2)	82(2)
C(32)	9404(5)	1589(5)	1100(2)	108(3)
C(33)	9540(4)	1229(4)	1625(2)	79(2)
F(1)	907(2)	1115(2)	2911(1)	71(1)
F(2)	2204(2)	954(2)	3230(1)	70(1)
F(3)	1618(2)	2104(2)	3241(1)	78(1)
O(3)	335(2)	1058(2)	3853(1)	52(1)
O(4)	1702(2)	1214(2)	4201(1)	60(1)
C(34)	1456(3)	1326(3)	3308(2)	47(2)
C(35)	1120(3)	1177(3)	3841(2)	43(2)

Tabelle 7-30: Koeffizienten U_{ij} der Schwingungstensoren in Verbindung 4.

Atom	$U_{11} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{22} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{33} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{23} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{13} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$	$U_{12} [\text{\AA}^2 \cdot 10^{-3}]$
N(1)	37(2)	80(3)	42(2)	2(2)	9(2)	2(2)
N(2)	42(2)	109(4)	31(2)	3(2)	5(2)	0(2)
N(3)	35(2)	52(2)	29(2)	-1(2)	0(2)	-1(2)
N(4)	110(4)	58(3)	28(2)	-3(2)	2(2)	-8(2)
C(1)	41(3)	44(3)	38(2)	-6(2)	1(2)	-3(2)
C(2)	38(3)	55(3)	31(2)	-1(2)	-1(2)	-4(2)
C(3)	42(3)	54(3)	39(3)	-4(2)	5(2)	-1(2)
C(4)	39(3)	60(3)	43(3)	-1(2)	0(2)	1(2)
C(5)	45(3)	56(3)	36(2)	-1(2)	0(2)	1(2)
C(6)	37(3)	47(2)	32(2)	-1(2)	0(2)	1(2)
C(7)	38(3)	41(2)	33(2)	-2(2)	-1(2)	-2(2)
C(8)	43(3)	50(3)	32(2)	0(2)	-3(2)	1(2)
C(9)	42(3)	51(3)	30(2)	-1(2)	-1(2)	-2(2)
C(10)	36(3)	62(3)	42(3)	1(2)	3(2)	1(2)
C(11)	36(2)	63(3)	32(2)	2(2)	0(2)	0(2)
C(12)	41(3)	43(2)	27(2)	-3(2)	-1(2)	-3(2)
C(13)	42(3)	40(2)	34(2)	-3(2)	5(2)	-4(2)
C(14)	34(3)	77(3)	35(2)	4(2)	-3(2)	1(2)
C(15)	48(3)	75(3)	50(3)	13(2)	5(2)	9(3)
C(16)	38(3)	48(3)	32(2)	3(2)	3(2)	0(2)
C(17)	58(3)	44(3)	34(2)	5(2)	4(2)	2(2)
C(18)	64(3)	48(3)	40(3)	-9(2)	4(2)	-7(2)
C(19)	50(3)	50(3)	34(2)	3(2)	0(2)	-1(2)
C(20)	49(3)	50(3)	36(3)	7(2)	3(2)	3(2)
C(21)	44(3)	55(3)	35(2)	-7(2)	7(2)	-5(2)
C(22)	116(5)	72(4)	38(3)	-4(3)	12(3)	-3(3)
C(23)	126(6)	78(4)	61(3)	2(3)	19(4)	9(4)
C(24)	67(3)	64(3)	31(2)	3(2)	0(2)	-2(3)
C(25)	104(5)	89(4)	86(4)	15(3)	-2(4)	9(4)
O(1)	88(3)	83(3)	99(3)	4(2)	15(3)	-4(2)
C(26)	152(7)	84(5)	88(5)	0(4)	25(5)	15(5)
C(27)	122(6)	118(6)	88(5)	-25(4)	37(5)	-7(5)
C(28)	87(5)	118(6)	128(6)	-1(5)	22(5)	7(4)
C(29)	79(4)	103(5)	90(4)	6(4)	-1(4)	-14(4)
O(2)	63(2)	96(3)	42(2)	-9(2)	5(2)	10(2)
C(30)	59(3)	77(4)	69(4)	-7(3)	-5(3)	6(3)
C(31)	106(5)	85(4)	51(3)	8(3)	-13(3)	-2(4)

C(32)	95(5)	171(7)	58(4)	-2(4)	15(4)	20(5)
C(33)	64(4)	110(5)	62(3)	-10(3)	6(3)	13(3)
F(1)	54(2)	121(2)	39(2)	-15(2)	2(1)	-11(2)
F(2)	50(2)	108(2)	55(2)	7(2)	15(1)	13(2)
F(3)	114(3)	63(2)	57(2)	9(1)	10(2)	-12(2)
O(3)	37(2)	73(2)	45(2)	6(2)	3(1)	-1(2)
O(4)	45(2)	96(3)	37(2)	-1(2)	-4(2)	0(2)
C(34)	36(3)	58(3)	45(3)	-5(2)	-6(2)	2(2)
C(35)	39(3)	52(3)	38(3)	-1(2)	1(2)	4(2)

8. Literaturverzeichnis

- [1] N. Cartier, S. Hasein-Bey-Abina, C. C. Bartholomae, G. Veres, M. Schmidt, I. Kutschera, M. Vidaud, U. Abel, L. Dal-Cortivo, L. Caccavelli, N. Mahlaoui, V. Kiermer, D. Mittelstaedt, C. Bellesme, N. Lahlou, F. Lefrère, S. Blanche, M. Audit, E. Payen, P. Leboulch, B. l'Homme, P. Bougnères, C. vonKalle, A. Fischer, M. Cavazzana-Calvo, P. Aubourg, *Science* **2009**, 326, 818-823.
- [2] *Deutsches Ärzteblatt* **2009**, 106, (46), 2284.
- [3] G. M. Blackburn, M. J. Gait, *Nucleic acids in chemistry and biology*. 2. Ausg.; Oxford University Press: Oxford, New York, Tokyo, 1996; p 1-14.
- [4] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **1944**, 79, 137-158.
- [5] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* **1953**, 171, 737-738.
- [6] F. S. Collins, M. Morgan, A. Patrinos, *Science* **2003**, 300, (286-290).
- [7] F. Sanger, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1977**, 74, 5463-5467.
- [8] R. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3045-3046.
- [9] R. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
- [10] M. Caruthers, *Methods Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.
- [11] H. Higuchi, *Nature* **1988**, 332, 543-546.
- [12] J. C. V. e. al., *Science* **2001**, 291, 1304-1351.
- [13] P.-Y. Kwok, X. Chen, *Curr. Iss. Mol. Biol.* **2003**, 5, 43-60.
- [14] E. Lai, J. Riley, I. Purvis, A. Roses, *Genomics* **1998**, 54, 31-38.
- [15] M. Cargill, et-al., *Nature Genet* **1999**, 22, 231-238.
- [16] M. K. Halushka, et-al., *Nature Genet* **1999**, 22, (239-247).
- [17] J. Yokota, *Carcinogenesis* **2000**, 21, 497-503.
- [18] F. Patolsky, Y. Weizmann, I. Willner, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 770-772.
- [19] W. E. Evans, M. V. Relling, *Science* **1999**, 286, 487-491.
- [20] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nature Biotechnol.* **2000**, 18, 505-508.
- [21] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1623-1633.
- [22] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 7842-7849.
- [23] C. M. Niemeyer, D. Blohm, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2865-2869.
- [24] S. R. Rajski, B. A. Jackson, J. K. Barton, *Mutation Res.* **2000**, 447, 49-72.
- [25] J.-B. LePecq, C. Paoletti, *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 87-106.
- [26] C. Aaij, P. Borst, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 269, 192-200.
- [27] L. Valis, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 36-38.
- [28] L. Valis. Ladungstransfer in synthetischer DNA mit Ethidium als Basensurrogat oder pyrenmodifizierten Guanin. Dissertation, TU München, 2007.
- [29] H.-A. Wagenknecht, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, 1130, 122-130.
- [30] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 10192-10195.
- [31] A. Harriman, G. R. Millward, P. Neta, M. C. Richoux, J. M. Thomas, *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 1286-1290.
- [32] A. J. Bard, A. Ledwith, H. J. Shine, *Advances in Physical Organic Chemistry* **1976**, 13, 155-278.
- [33] B. A. Armitage, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 253, 55-76.
- [34] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1970**, 54, 247-279.
- [35] L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 18-30.
- [36] H. Ihmels, D. Otto, *Top. Curr. Chem.* **2005**, 258, 161-204.
- [37] H. Schmaderer. Spektroskopische Charakterisierung des Interkalationsverhaltens planarer aromatischer Heterozyklen in Kalbsthymus-DNA. Diplomarbeit, Universität Ulm, 2005.

- [38] K. Faulhaber. Untersuchung der Wechselwirkung von annelierten Chinoliziniumsalzen mit DNA. Dissertation, Universität Würzburg, 2003.
- [39] W. D. Wilson, *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. 2. Ausg.; Hrsg. G. M. Blackburn, M. J. Gait: Oxford, UK, 1996; p 329-374.
- [40] S. K. Kim, B. Norden, *FEBS Lett.* **1993**, 315, 61-64.
- [41] B. Nordén, T. Kurucsev, *J. Mol. Recognition* **1994**, 7, 141-155.
- [42] J. G. Pelton, D. E. Wimmer, *Biochem.* **1988**, 27, 8088-8096.
- [43] J. G. Pelton, D. E. Wimmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 5723-5727.
- [44] C. Bailly, J. B. Chaires, *Bioconj. Chem.* **1998**, 9, 513-538.
- [45] J. Pauluhn, H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1978**, 82, 1265-1278.
- [46] H. W. Zimmermann, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 115-131.
- [47] L. S. Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1963**, 49, 94-102.
- [48] C. Medhi, J. B. O. Mitchell, S. L. Price, A. B. Tabor, *Biopolymers* **1999**, 52, 84-93.
- [49] F. Gago, *Methods* **1998**, 14, 277-292.
- [50] W. Fuller, M. J. Waring, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1964**, 68, 805-808.
- [51] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 269-282.
- [52] M. J. Waring, *Mol. Pharmacol.* **1965**, 1, 1-13.
- [53] C. C. Tsai, S. C. Jain, H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* **1977**, 114, 301-315.
- [54] S. C. Jain, C. C. Tsai, H. M. Sobell, *J. Mol. Biol.* **1977**, 114, 317-331.
- [55] C.-C. Tsai, S. C. Jain, H. M. Sobell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 628-632.
- [56] J. Sartorius, H. J. Schneider, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1997**, 2319-2328.
- [57] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*. 1. Ausg.; Springer: New York, 1988; p 350-367.
- [58] S. Rao, P. Kollman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 5735-5739.
- [59] D. Suh, J. B. Chaires, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 723-728.
- [60] E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 271-273.
- [61] H. Tsukube, H. Futura, A. Odani, Y. Takeda, Y. Kudo, Y. Inoue, Y. Liu, H. Sakamoto, K. Kimura, *Physical Methods in Supramolecular Chemistry*. In *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, 1. Ausg.; Hrsg. H. J. L. Atwood, J. E. D. Davies, D. D. Macnicol, F. Vögtle, Pergamon: Rugby, UK, 1996; pp 425-482.
- [62] G. Maas, H.-G. Herz, E. Scheppach, B. S. Palm, H.-J. Schneider, *Z. Naturforsch.* **2004**, 59b, 486-497.
- [63] J. Ren, T. C. Jenkins, J. B. Chaires, *Biochem.* **2000**, 39, 8439-8447.
- [64] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*. WILEY-VCH: Weinheim, Germany, 2002.
- [65] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 2. Ausg.; Kluwer Academic/ Plenum Publishers: New York, 1999.
- [66] T. Ehrenschwender. Synthese und Untersuchung BDP-modifizierter Nukleoside und Oligonukleotide. Diplomarbeit, Universität Regensburg, 2007.
- [67] C. Reichardt, *Angew. Chem.* **1979**, 91, 119-131.
- [68] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*. WILEY-VCH: Weinheim, Germany, 2002; p 200 - 220.
- [69] K. G. Casey, E. L. Quitevis, *J. Phys. Chem.* **1988**, 92, 6590-6594.
- [70] T. Förster, G. Hoffmann, *Z. Phys. Chem. N. F.* **1971**, 75, 63.
- [71] M. Vogel, W. Rettig, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1985**, 89, 962-968.
- [72] M. Vogel, W. Rettig, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1987**, 91, 1241-1247.
- [73] W. Rettig, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 969-986.
- [74] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3899-4031.
- [75] P. Plaza, N. D. Hung, M. M. Martin, Y. H. Meyer, M. Vogel, W. Rettig, *Chem. Phys.* **1992**, 168, 365-373.
- [76] Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, A. Siemiarczuk, *J. Lumin.* **1979**, 18-19, 420-424.

- [77] J. Lipinski, H. Chojnacki, Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 70, 449-453.
- [78] K. Rotkiewicz, W. Rubaszewska, *Chem. Phys. Lett.* **1980**, 70, 444-448.
- [79] Z. R. Grabowski, *Pure Appl. Chem.* **1993**, 65, 1751-1756.
- [80] K. A. Zachariasse, M. Grobys, T. v. d. Haar, A. Hebecker, Y. V. Il'ichev, O. Morawski, I. Rückert, W. Kühnle, *J. Photochem. Photobiol. A* **1997**, 105, 373-383.
- [81] K. A. Zachariasse, M. Grobys, T. v. d. Haar, A. Hebecker, Y. V. Il'ichev, Y. B. Jiang, O. Morawski, *J. Photochem. Photobiol. A* **1996**, 102, 59-70.
- [82] H. W. Zimmermann, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 115-131.
- [83] G. Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1949**, 51, 660-672.
- [84] R. L. Scott, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1956**, 75, 787-789.
- [85] H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2703-2707.
- [86] J. D. McGhee, P. H. v. Hippel, *J. Mol. Biol.* **1974**, 86, 469-489.
- [87] S. J. Strickler, R. A. Berg, *J. Chem. Phys.* **1962**, 37, 814-822.
- [88] M. Kasha, *Discussions of the Faraday Society* **1950**, 9, 14-19.
- [89] B. Cohen, C. E. Crespo-Hernández, B. Kohler, *Faraday Discuss.* **2004**, 127, 137-147.
- [90] P. O'Neill, M. Fielden, *Adv. Radiation Biol.* **1993**, 17, 53-120.
- [91] J. H. J. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, 411, 366-374.
- [92] D. Wang, D. A. Kreutzer, J. M. Essigmann, *Mutation Res.* **1998**, 400, 99-115.
- [93] E. M. Boon, A. L. Livingston, N. H. Chmiel, S. S. David, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 12543-12547.
- [94] A. K. Boal, E. Yavin, O. A. Lukianova, V. L. O'Shea, S. S. David, J. K. Barton, *Biochemistry* **2005**, 44, 8397-8407.
- [95] E. Yavin, A. K. Boal, E. D. A. Stemp, E. M. Boon, A. L. Livingston, V. L. O'Shea, S. S. David, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 3546-3551.
- [96] S. R. Rajski, J. K. Barton, *Biochemistry* **2001**, 40, 5556-5564.
- [97] R. L. Letsinger, V. Mahadevan, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 3526-3527.
- [98] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859-1862.
- [99] M. H. Caruthers, A. D. Barone, S. L. Beaucage, D. R. Dodds, E. F. Fisher, L. J. McBride, M. Matteucci, Z. Stabinsky, J.-Y. Tang, *Meth. Enzymol.* **1987**, 154, 287-313.
- [100] T. Schultz, E. Samoylova, W. Radloff, I. V. Hertel, A. L. Sobolewski, W. Domcke, *Science* **2004**, 306, 1765-1793.
- [101] H.-A. Wagenknecht, *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 251-266.
- [102] R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 744-751.
- [103] N. Amann, R. Huber, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1845-1847.
- [104] N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1685-1690.
- [105] D. Loakes, D. M. Brown, *Nucl. Acids Res.* **1994**, 22, 4039-4043.
- [106] D. Loakes, F. Hill, D. M. Brown, S. A. Salisbury, *J. Mol. Biol.* **1997**, 270, 426-435.
- [107] E. Mayer, L. Valis, R. Huber, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Synthesis* **2003**, 2335-2340.
- [108] C. Wanninger-Weiß, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 64-71.
- [109] C. Wanninger-Weiß, F. Di Pasquale, T. Ehrenschwender, A. Marx, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2008**, 1443-1445.
- [110] E. Mayer, L. Valis, C. Wagner, M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *ChemBioChem* **2004**, 5, 865-868.
- [111] M. Rist, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 2498-2504.
- [112] C. Wagner, M. Rist, E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 2062-2063.
- [113] S. I. Khan, M. W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 4704-4705.

- [114] L. Zhang, H. Long, G. E. Boldt, K. D. Janda, G. C. Schatz, F. D. Lewis, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 314-322.
- [115] A. Stutz, S. M. Langenegger, R. Häner, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 3156-3163.
- [116] F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, M. R. Wasielewski, *Science* **1997**, 277, 673-676.
- [117] F. D. Lewis, X. Liu, Y. Wu, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, R. L. Letsinger, R. Sanishvili, A. Joachimiak, V. Tereshko, M. Egli, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9905-9906.
- [118] F. D. Lewis, X. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11280-11281.
- [119] C. Behrens, M. Ober, T. Carell, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3281-3289.
- [120] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Bioconjugate Chem.* **1999**, 10, 1122-1130.
- [121] H. Meier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 2482-2506.
- [122] A. Weller, *Z. Phys. Chem.* **1982**, 133, 93-98.
- [123] K. Kumar, I. V. Kurnikov, D. N. Beratan, D. H. Waldeck, M. B. Zimmt, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 5529-5541.
- [124] J. K. Barton, C. V. Kumar, N. J. Turro, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6391-6393.
- [125] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811, 265-322.
- [126] C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Science* **1993**, 262, 1025-1029.
- [127] R. E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2714-2730.
- [128] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 67-115.
- [129] M. A. O'Neill, J. K. Barton, Sequence-dependent DNA Dynamics: The Regulator of DNA-mediated Charge Transport. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 27-76.
- [130] T. J. Meade, J. F. Kayyem, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 352-354.
- [131] S. O. Kelley, R. E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 9861-9870.
- [132] K. Fukui, K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 158-161.
- [133] K. Kino, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7373-7374.
- [134] H. Ikeda, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10836-10837.
- [135] K. Nakatani, I. Saito, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 163-186.
- [136] C. Wan, T. Fiebig, S. O. Kelley, C. Treadway, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 6014-6019.
- [137] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Science* **1999**, 283, 375-381.
- [138] C. Wan, T. Fiebig, O. Schiemann, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 14052-14055.
- [139] D. Ly, L. Sani, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 9400-9410.
- [140] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 4399-4408.
- [141] G. B. Schuster, *Acc. Chem. Res.* **2000**, 33, 253-260.
- [142] S. Hess, M. Götz, W. B. Davis, M.-E. Michel-Beyerle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10046-10055.
- [143] K. Kawai, T. Takada, S. Tojo, T. Majima, *Tetrahedron Letters* **2002**, 43, 89-91.
- [144] K. Nakatani, C. Dohno, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 6802-6803.
- [145] M. Pascaly, J. Yoo, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 9083-9092.
- [146] C. Dohno, A. Ogawa, K. Nakatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 10154-10155.
- [147] M. A. O'Neill, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11471-11483.

- [148] C.-S. Liu, R. Hernandez, G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 2877-2884.
- [149] F. Shao, M. A. O'Neill, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 17914-17919.
- [150] F. D. Lewis, Y. Wu, L. Zhang, X. Zuo, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8206-8215.
- [151] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, T. Fiebig, M. Raytchev, Q. Wang, V. Shafirovich, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 791-800.
- [152] L. Valis, Q. Wang, M. Raytchev, I. Buchvarov, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 10192-10195.
- [153] E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 12950-12955.
- [154] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12759-12765.
- [155] C. A. M. Seidel, A. Schulz, M. H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.* **1996**, 100, 5541-5553.
- [156] S. Steenken, S. V. Jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 617-618.
- [157] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**, 406, 51-53.
- [158] M. E. Núñez, D. B. Hall, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 85-97.
- [159] J. Yoo, S. Delaney, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 6640-6641.
- [160] S. Delaney, J. K. Barton, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 6475-6483.
- [161] S. Delaney, J. Yoo, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 10511-10516.
- [162] T. T. Williams, D. T. Odom, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 9048-9049.
- [163] B. Giese, M. Spichty, *ChemPhysChem* **2000**, 1, 195-198.
- [164] B. Giese, A. Biland, *Chem. Commun.* **2002**, 667-672.
- [165] B. Giese, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, 6, 612-618.
- [166] T. Kendrick, B. Giese, *Chem. Commun.* **2002**, 2016-2017.
- [167] E. Furrer, B. Giese, *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 3623-3632.
- [168] B. Giese, J. Amaudrut, A.-K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, 412, 318-320.
- [169] V. Sartor, E. Boone, G. B. Schuster, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 11057-11059.
- [170] F. D. Lewis, H. Zhu, P. Daublain, B. Cohen, M. R. Wasielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 7982-7985.
- [171] T. Takada, K. Kawai, X. Cai, A. Sugimoto, M. Fujitsuka, T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1125-1129.
- [172] H.-A. Wagenknecht, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 974-1006.
- [173] M. Spormann, B. Giese, *Synthesis* **2001**, 2156-2164.
- [174] V. Shafirovich, A. Dourandin, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 137-139.
- [175] V. Y. Shafirovich, S. H. Courtney, N. Ya, N. E. Geacintov, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4920-4929.
- [176] V. Shafirovich, A. Dourandin, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 8431-8435.
- [177] V. Shafirovich, A. Dourandin, W. Huang, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10924-10933.
- [178] R. Huber, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Commun.* **2003**, 1878-1879.
- [179] S. Steenken, *Free Rad. Res. Comms.* **1992**, 16, 349-379.
- [180] D. B. Hall, R. E. Holmlin, J. K. Barton, *Nature* **1996**, 382, 731-735.
- [181] K. E. Augustyn, J. C. Genereux, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 5731-5733.

- [182] G. B. Schuster, U. Landman, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 139-161.
- [183] M. A. O'Neill, H.-C. Becker, C. Wan, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, 42, 5896-5900.
- [184] B. Giese, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, 71, 51-70.
- [185] S. Steenken, J. P. Telo, H. M. Novais, L. P. Candeias, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 4701-4709.
- [186] P. Kaden, E. Mayer-Enthart, A. Trifonov, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, 44, 1637-1639.
- [187] M. Raytchev, E. Mayer, N. Amann, H.-A. Wagenknecht, T. Fiebig, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 706-712.
- [188] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1871-1876.
- [189] C. Behrens, L. T. Burgdorf, A. Schwögler, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 1763-1766.
- [190] C. Haas, K. Kräling, M. Cichon, N. Rahe, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1842-1844.
- [191] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11480-11481.
- [192] T. Ito, S. E. Rokita, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1839-1842.
- [193] O. Schiemann, E. Feresin, T. Carl, B. Giese, *ChemPhysChem* **2004**, 5, 270-274.
- [194] B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 1848-1851.
- [195] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 48-50.
- [196] P. Daublain, A. K. Thazhathveetil, Q. Wang, A. Trifonov, T. Fiebig, F. D. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 16790-16797.
- [197] T. Fiebig, C. Wan, A. H. Zewail, *ChemPhysChem* **2002**, 3, 781-788.
- [198] N. Amann, E. Pandurski, T. Fiebig, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4877-4883.
- [199] C. Wanninger-Weiß, L. Valis, J. Barbaric, H.-A. Wagenknecht, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, 16, 100-106.
- [200] C. Wanninger-Weiß. Ladungstransfer in DNA mit Indol, Ethidium und Pyren als Fluoreszenzsonden: Synthese, Spektroskopie und Primerverlängerung. Dissertation, Universität Regensburg, 2008.
- [201] S. T. Gaballah, J. D. Vaught, B. E. Eaton, T. L. Netzel, *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 5927-5934.
- [202] F. Menacher, M. Rubner, S. Berndl, H.-A. Wagenknecht, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4263-4266.
- [203] A. Messer, K. Carpenter, K. Forzley, J. Buchanan, S. Yang, Y. Razskazovskii, Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 1128-1136.
- [204] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 10406-10411.
- [205] Z. Cai, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 6942-6949.
- [206] Z. Cai, Z. Gu, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 6031-6041.
- [207] Z. Cai, X. Li, M. D. Sevilla, *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 2755-2762.
- [208] A. Manetto, S. Breeger, C. Chatgililoglu, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 318-321.
- [209] C. Behrens, M. K. Cichon, F. Grolle, U. Hennecke, T. Carell, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 187-204.
- [210] T. Carell, M. v. Meltzer, Excess Electron Transfer in DNA Probed with Flavin- and Thymine-Dimer-modified Oligonucleotides. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 77-92.
- [211] S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8557-8558.

- [122] M. P. Scannell, D. J. Fenick, S.-R. Yeh, D. E. Falvey, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 1971-1977.
- [123] T. Chen, G. P. Cook, A. T. Koppisch, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3861-3866.
- [124] H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6720-6721.
- [125] S. E. Rokita, T. Ito, Chemical Probing of Reductive Electron Transfer in DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 133-152.
- [126] E. Rivera, R. H. Schuler, *J. Phys. Chem.* **1983**, 87, 3966-3971.
- [127] C. M. Niemeyer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2001**, 40, 4128-4158.
- [128] A. R. Pike, L. H. Lie, R. A. Eagling, L. C. Ryder, S. N. Patole, B. A. Connolly, B. R. Horrocks, A. Houlton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2002**, 41, 615-617.
- [129] E. M. Boon, J. E. Salas, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2002**, 20, 282-286.
- [120] N. M. Jackson, M. G. Hill, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 209-215.
- [121] G. Hartwich, D. J. Caruana, T. d. Lumley-Woodyear, Y. Wu, C. N. Campbell, A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 10803-10812.
- [122] C. Mao, W. Sun, Z. Shen, N. C. Seeman, *Nature* **1999**, 397, 144-146.
- [123] H.-W. Fink, C. Schönenberger, *Nature* **1999**, 398, 407-410.
- [124] D. Porath, A. Bezryadin, S. d. Vries, C. Dekker, *Nature* **2000**, 403, 635-638.
- [125] P. Fromherz, B. Rieger, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 5361-5362.
- [126] A. M. Brun, A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 3656-3660.
- [127] V. Y. Shafirovich, A. Dourandin, N. P. Luneva, N. E. Geacintov, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 5863-5868.
- [128] F. D. Lewis, R. L. Letsinger, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, 3, 215-221.
- [129] F. D. Lewis, T. Wu, X. Liu, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, S. E. Miller, M. R. Wasielewski, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 2889-2902.
- [130] F. D. Lewis, Y. Wu, X. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12165-12173.
- [131] F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 236, 45-65.
- [132] F. D. Lewis, M. R. Wasielewski, Dynamics of Photoinitiated Hole and Electron Injection in Duplex DNA. In *Charge Transfer in DNA - From Mechanism to Application*, Hrsg. H.-A. Wagenknecht, Wiley-VCH: Weinheim, 2005; pp 93-116.
- [133] R. F. Anderson, G. A. Wright, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **1999**, 1, 4827-4831.
- [134] Z. Cai, M. D. Sevilla, *Top. Curr. Chem.* **2004**, 237, 103-127.
- [135] C. Behrens, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 1632-1633.
- [136] A. Schwögler, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 3918-3920.
- [137] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15552-15559.
- [138] T. Ito, A. Kondo, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10934-10942.
- [139] S. Breger, M. v. Meltzer, U. Hennecke, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 6469-6477.
- [140] F. Shao, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 14733-14738.
- [141] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109-1151.
- [142] S. Steenken, *Chem. Rev.* **1989**, 89, 503-520.
- [143] L. T. Burgdorf, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 293-301.
- [144] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, 431, 217-221.
- [145] Y. Guan, R. C. Manuel, A. S. Arvai, S. S. Parikh, C. D. Mol, J. H. Miller, R. S. Lloyd, J. A. Tainer, *Nature Struct. Biol.* **1998**, 5, 1058-1064.
- [146] J. N. A. Tetley, G. G. Skellern, J. M. Midgley, M. H. Grant, A. R. Pitt, *Chem. Biol. Interact.* **1999**, 123, 105-115.
- [147] J. N. A. Tetley, G. G. Skellern, M. H. Grant, J. M. Midgley, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 21, 1-7.

- [248] W. H. Elliott, *Biochem. J.* **1963**, 86, 562-567.
- [249] M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1965**, 13, 269-282.
- [250] J. W. Nelson, I. Tinoco, *Biochemistry* **1985**, 24, 6416-6421.
- [251] P. T. Henderson, E. Boone, G. B. Schuster, *Helv. Chim. Acta* **2002**, 85, 135-151.
- [252] C. Aaij, P. Borst, *Biochim. Biophys. Acta* **1972**, 269, 192-200.
- [253] J.-B. LePecq, C. Paleotti, *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 87-106.
- [254] V. W. F. Burns, *Arch. Biochem. Biophys.* **1969**, 133, 420-424.
- [255] B. Hudson, R. Jacobs, *Biopolymers* **1975**, 14, 1309-1312.
- [256] J. Olmsted, III, D. R. Kearns, *Biochemistry* **1977**, 16, 3647-3654.
- [257] A. R. Morgan, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, N. L. Murray, D. H. Evans, *Nucl. Acids Res.* **1979**, 7, 547-569.
- [258] A. R. Morgan, D. H. Evans, J. S. Lee, D. E. Pulleyblank, *Nucl. Acids Res.* **1979**, 7, 571-594.
- [259] P. B. Dervan, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9, 2215-2235.
- [260] W. C. Tse, D. L. Boger, *Acc. Chem. Res.* **2004**, 37, 61-69.
- [261] E. N. Timofeev, I. P. Smirnov, L. A. Haff, E. I. Tishchenko, A. D. Mirzabekov, V. L. Florentiev, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8467-8470.
- [262] S. V. Kochetkova, E. I. Tishchenko, E. N. Timofeev, I. L. Shchhaveleva, V. L. Florentiev, *Nucleosides & Nucleotides* **1999**, 18, 1495-1496.
- [263] T. Fiebig, C. Wan, S. O. Kelley, J. K. Barton, A. H. Zewail, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1187-1192.
- [264] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 3045-3046.
- [265] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2149-2154.
- [266] D. M. Hammond, A. Manetto, J. Gierlich, V. A. Azov, P. M. E. Gramlich, G. A. Burley, M. Maul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 4184-4187.
- [267] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 1398-1399.
- [268] J. J. Storhoff, C. A. Markin, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 1849-1862.
- [269] Q. Gu, C. Cheng, R. Gonela, S. Suryanarayanan, *Nanotechnol.* **2006**, 17, R14.
- [270] L. A. Agrofoglio, I. Gillaizeau, Y. Saito, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 1875-1916.
- [271] C. Wojczewski, K. Stolze, J. W. Engels, *Synlett* **1999**, 1667-1678.
- [272] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057 - 3064.
- [273] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 2004 - 2021.
- [274] V. V. Rostovstev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 2596-2599.
- [275] R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1962**, 2, 565-598.
- [276] R. Huisgen, *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*. 1 Ausg.; Wiley: New York, 1984.
- [277] P. M. Gramlich, C. T. Wirges, A. Manetto, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8350-8358.
- [278] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 7108-7133.
- [279] H. Mader, X. Li, S. Saleh, M. Link, P. Kele, O. S. Wolfbeis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2008**, 1130, 218-223.
- [280] J.-F. Lutz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 1018-1025.
- [281] S. Iida, N. Asakura, K. Tabata, I. Okura, T. Kamachi, *ChemBioChem* **2006**, 7, 1853-1855.
- [282] V. Aucagne, D. A. Leigh, *Org. Lett.* **2006**, 8, 4505-4507.
- [283] H. T. T. Brink, J. T. Meijer, R. V. Geel, M. Damen, D. W. P. M. Löwik, J. C. M. v. Hest, *J. Pept. Sci.* **2006**, 12, 686-692.
- [284] A. J. Link, M. K. S. Vink, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10598-10602.
- [285] A. E. Speers, B. F. Carvett, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 535-546.

- [286] T. Liebert, C. Hänsch, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, 27, 208-213.
- [287] Q. Wang, T. R. Chan, R. Hilgraf, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3192-3193.
- [288] J. A. Link, D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11164-11165.
- [289] S. Thyagarajan, N. N. Murthy, A. A. N. Sarjeant, K. D. Karlin, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 7003-7008.
- [290] T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2004**, 6, 2853-2855.
- [291] F. Seela, V. R. Sirivolu, *Chem. Biodiversity* **2006**, 3, 509 - 514.
- [292] J. Gierlich, G. A. Burley, P. M. E. Gramlich, D. M. Hammond, T. Carell, *Org. Lett.* **2006**, 8, 3639-3642.
- [293] S. Berndt, N. Herzig, P. Kele, D. Lachmann, X. Li, O. S. Wolfbeis, H.-A. Wagenknecht, *Bioconjugate Chem.* **2009**, 20, 558 - 564.
- [294] F. Amblard, J. H. Cho, R. F. Schinazi, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 4207-4220.
- [295] T. S. Seo, Z. Li, H. Ruparel, J. Ju, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 609-612.
- [296] R. Kumar, A. El-Sagheer, J. Tumpene, P. Lincoln, L. M. Wilhemsson, T. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6859-6864.
- [297] A. M. Jawalekar, N. Meeuwenoord, J. S. G. O. Cremers, F. P. J. T. Rutjes, F. L. v. Delft, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 287-290.
- [298] D. Graham, J. A. Parkinson, T. Brown, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1998**, 1131-1138.
- [299] M. Grotli, M. Douglas, R. Eritja, B. S. Sproat, *Tetrahedron* **1998**, 54, 5899-5914.
- [300] V. A. Korshun, D. A. Stetsenko, M. J. Gait, *J. Chem. Soc. - Perkin Trans. I* **2002**, 1092-1104.
- [301] A. V. Ustinov, V. A. Korshun, *Russ. Chem. Bull., Int. Ed.* **2006**, 55, 1268-1274.
- [302] D. I. Rozkiewicz, J. Gierlich, G. A. Burley, K. Gutmiedl, T. Carell, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *ChemBioChem* **2007**, 9, 1997-2002.
- [303] P. M. E. Gramlich, S. Warncke, J. Gierlich, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3442-3444.
- [304] A. Salic, T. J. Mitchison, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 2415-2420.
- [305] D. G. Wang, J.-B. Fan, C.-J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E. S. Lander, *Science* **1998**, 280, 1077-1082.
- [306] A. J. Schafer, J. R. Hawkins, *Nature Biotechnol.* **1998**, 16, 33-39.
- [307] A. J. Brookes, *Gene* **1999**, 234, 177-186.
- [308] A. N. Bullock, A. R. Fersht, *Nature Rev. Cancer* **2001**, 1, 68-76.
- [309] B. Vogelstein, D. Lane, A. J. Levine, *Nature* **2000**, 408, 307-310.
- [310] T. G. Drummond, M. G. Hill, J. K. Barton, *Nature Biotechnol.* **2003**, 21, 1192-1199.
- [311] A. C. Syvänen, *Human Mut.* **1999**, 13, 1-10.
- [312] R. W. Kwiatkowski, V. Lyamichev, M. deArruda, B. Neri, *Mol. Diagn.* **1999**, 4, 353-364.
- [313] K. J. Livak, *PCR Methods Appl.* **1995**, 4, 357.
- [314] R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 5487-5502.
- [315] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nature Biotechnol.* **1996**, 14, 303-308.
- [316] A. Okamoto, K. Kanatani, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4820-4827.
- [317] A. Okamoto, K. Tanaka, T. Fukuta, I. Saito, *ChemBioChem* **2004**, 5, 958-963.
- [318] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Chem. Commun.* **2004**, 1704-1705.
- [319] Y. Saito, Y. Miyauchi, A. Okamoto, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7827-7831.
- [320] A. Okamoto, K. Tainaka, Y. Ochi, K. Kanatami, I. Saito, *Mol. Biosyst.* **2006**, 2, 122-127.

- [321] O. Seitz, F. Bergmann, D. Heindl, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1999**, 38, 2203-2206.
- [322] O. Köhler, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2003**, 2938-2939.
- [323] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *Chem. Commun.* **2004**, 2674-2675.
- [324] D. V. Jarikote, O. Köhler, E. Socher, O. Seitz, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3187-3195.
- [325] O. Köhler, D. V. Jarikote, O. Seitz, *ChemBioChem* **2005**, 6, 69-77.
- [326] V. Karunakaran, J. L. P. Lustres, L. Zhao, N. P. Ernsting, O. Seitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 2954-2962.
- [327] T. Troll, In *Methoden der organischen Chemie/ Heterarene II*, Hrsg. J. Houben, T. Weyl, Thieme: Stuttgart, New York, 1992; pp 157-204.
- [328] R. V. Guntaka, B. J. Mahy, J. M. Bishop, H. E. Varmus, *Nature* **1975**, 253, 507-511.
- [329] N. W. Luedtke, Y. Tor, *Biopolymers* **2003**, 70, 103-119.
- [330] V. L. Singer, T. E. Lawlor, S. Yue, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* **1999**, 439, 37-47.
- [331] M. Fukunaga, B. A. Cox, R. S. v. Sprecken, L. W. Yielding, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen* **1984**, 127, 31-37.
- [332] T. Ohta, S. Tokishita, H. Yamagata, *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* **2001**, 492, 91-97.
- [333] S. Hoare, R. B. Kemp, M. A. Kaderbhai, *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, 21, 504.
- [334] P. K. Patra, J. R. Suresh, H. Ila, H. Junjappa, *Tetrahedron* **1998**, 54, 10167-10178.
- [335] J. Bastida, C. Codina, F. Viladomat, M. Rubiralta, J.-C. Quirion, B. J. Weniger, *J. Nat. Prod.* **1992**, 55, 122-125.
- [336] L. P. G. Wakelin, M. J. Waring, *Mol. Pharmacol.* **1974**, 10, 544-561.
- [337] M. I. Bret, O. Chalvet, *J. Mol. Struct.* **1977**, 37, 299-319.
- [338] C. Mehdi, J. B. Mitchell, S. L. Price, A. B. Tabor, *Biopolymers* **1999**, 52, 84-93.
- [339] D. Reha, M. Kabelác, F. Ryjáček, J. Sponer, J. E. Sponer, M. Elstner, S. Suhai, P. Hobza, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 3366-3376.
- [340] T. Kubar, M. Hanus, F. Ryjáček, P. Hobza, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 280-290.
- [341] G. Morgan, L. P. Walls, *J. Chem. Soc.* **1938**, 389-397.
- [342] L. P. Walls, *J. Chem. Soc.* **1945**, 294-300.
- [343] T. I. Watkins, *J. Chem. Soc.* **1952**, 3059-3064.
- [344] S. S. Berg, *J. Chem. Soc.* **1963**, 3635-3640.
- [345] M. LeBret, O. Chalvet, *J. Mol. Struct.* **1977**, 37, 299-319.
- [346] W. J. Firth, C. L. Watkins, D. E. Graves, L. W. Yielding, *J. Heterocycl. Chem.* **1983**, 20, 759-765.
- [347] N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 5235-5247.
- [348] V. Peytou, R. Condom, N. Patino, R. Guedj, A. M. Aubertin, N. Gelus, C. Bailly, R. Terreux, D. Cabrol-Bass, *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 4042-4053.
- [349] J. Loccufier, E. Schacht, *Tetrahedron* **1989**, 45, 3385-3396.
- [350] N. P. Gritsan, A. A. Koshkin, A. Y. Denisov, Y. Y. Markushin, E. V. Cherepanova, A. V. Lebedev, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1997**, 37, 40-51.
- [351] M. Fukunagu, L. W. Yielding, *Mutat. Res. Lett.* **1983**, 121, 89-94.
- [352] F. Leng, D. Graves, J. B. Chaires, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1442, 71-81.
- [353] L. W. Yielding, W. J. Firth, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1980**, 71, 161-168.
- [354] H. Jacquemin-Sablon, M. LeBret, A. Jacquemin-Sablon, C. Paoletti, *Biochemistry* **1979**, 18, 128-134.
- [355] L. W. Yielding, K. L. Yielding, J. E. Donoghue, *Biopolymers* **1984**, 23, 83-110.
- [356] N.-H. Ho, P. C. Tumeh, A. I. Kassis, *Nucl. Med. Biol.* **2001**, 28, 983-990.
- [357] T. Ren, D. P. Bancroft, W. I. Sundquist, A. Masschelein, M. V. Keck, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11341-11352.

- [358] L.-M. Tumir, I. Piantanida, P. Novak, M. Zinic, *J. Phys. Org. Chem.* **2002**, 15, 599-607.
- [359] F. Koeppel, J. F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P. B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Helene, J. L. Mergny, *Nucleic Acids Res.* **2001**, 29, 1087-1096.
- [360] T. I. Watkins, G. Woolfe, *Nature* **1952**, 169, 506.
- [361] S. O. Kelley, J. K. Barton, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 413-425.
- [362] W. Leupin, J. Feigon, W. A. Denny, D. T. Kearns, *Biophys. J.* **1985**, 22, 299-305.
- [363] N. C. Garbett, N. B. Hammond, D. E. Graves, *Biophys. J.* **2004**, 87, 3974-3981.
- [364] D. E. Graves, C. L. Watkins, L. W. Yielding, *Biochemistry* **1981**, 20, 1887-1892.
- [365] N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 495-508.
- [366] A. R. Katritzky, B. Yang, *J. Heterocyclic Chem.* **1996**, 33, 607-610.
- [367] T. Gerfaud, L. Neuville, J. Zhu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 572-577.
- [368] K. S. Currie, G. Tennant, *J. Chem. Soc. - Chem. Commun.* **1995**, 2295-2296.
- [369] J. Kristensen, M. Lysen, P. Vedse, M. Begtrup, *Org. Lett.* **2001**, 3, 1435-1437.
- [370] C. Lion, J. P. Boukou-Poba, C. Charvy, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1990**, 99, 171-181.
- [371] P. A. Keller, In *Science of Synthesis: Hetarenes and Related Ring Systems*, Hrsg. J. Houben, T. Weyl, Thieme: Stuttgart, New York, 2005; Vol. 15, pp 1065-1096.
- [372] J. Pawlas, M. Begtrup, *Org. Lett.* **2002**, 4, 2687-2690.
- [373] M. Lysen, J. L. Kristensen, P. Vedso, M. Begtrup, *Org. Lett.* **2002**, 4, 257-259.
- [374] E. Subramanian, J. Trotter, *J. Cryst. Mol. Struct.* **1971**, 1, 3-15.
- [375] S. K. Pal, D. Mandal, K. Bhattacharyya, *J. Phys. Chem. B* **1998**, 102, 11017-11023.
- [376] D. F. Eaton, *Pure Appl. Chem.* **1988**, 60, 1107 - 1114.
- [377] Y. Marcus, *J. Solution Chem.* **1984**, 13, 599-624.
- [378] J. Stangret, *J. Mol. Struct.* **2002**, 643, 29-35.
- [379] U. Mayer, *Monatshefte für Chemie* **1975**, 106, 1235-1257.
- [380] M. J. Kamlet, R. W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 377-383.
- [381] E. Lippert, *Z. Elektrochem. Ber. Bunsenges. physik. Chem.* **1957**, 61, 962-975.
- [382] H. Ihmels, B. Engels, K. Faulhaber, C. Lennartz, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 2854-2864.
- [383] A. Granzhan, H. Ihmels, G. Viola, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 1254-1267.
- [384] D. Panda, A. Datta, *J. Chem. Phys.* **2006**, 125, 054513.
- [385] M. Demeunynck, C. Bailly, W. D. Wilson, *Small molecule DNA and RNA binders*. Wiley-VCH: Weinheim, 2003.
- [386] I. R. Epstein, *Biophys. Chem.* **1978**, 8, 327-339.
- [387] J. Pauluhn, H. W. Zimmermann, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **1979**, 83, 76-82.
- [388] E. D. Horowitz, N. V. Hud, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 15380-15381.
- [389] L. P. G. Wakelin, M. J. Waring, *J. Mol. Biol.* **1980**, 144, 183-214.
- [390] M. J. Waring, Antibiotics III: Mechanism of Action of Antimicrobial and Antitumor Agents. In Hrsg. J. W. Corcoran, F. E. Hahn, Springer: Heidelberg, 1975; pp 141-165.
- [391] W. D. Wilson, In *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, Hrsg. G. M. Blackburn, M. J. Gait, IRL Press: Oxford, UK, 1996.
- [392] R. Winter, F. Noll, *Methoden der biophysikalischen Chemie*. Teubner: Stuttgart, 1998.
- [393] N. C. Gabett, N. B. Hammond, D. E. Graves, *Biophys. J.* **2004**, 87, 3974-3981.
- [394] G. Cosa, K.-S. Focsaneanu, J. R. N. McLean, J. P. McNamee, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol.* **2001**, 73, 585-599.
- [395] H. Sugiyama, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7063-7068.
- [396] Glycerine, Producers', Association, *Physical Properties of Glycerine and its solutions*. New York, 1963; p 4 - 17.
- [397] M. Belletête, R. S. Sarpal, G. Durocher, *Chem. Phys. Lett.* **1993**, 201, 145-152.
- [398] A. Granzhan. Synthesis and Studies of Annelated Quinolizinium Derivatives as Versatile Constructs for Fluorescent Probes and Ligands for Triple-Helical and Abasic DNA Structures. Dissertation, Universität Siegen, 2006.

- [399] R. O. Loutfy, B. A. Arnold, *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 4205-4211.
- [400] J. H. Sommer, T. M. Nordlund, M. McGuire, G. McLendon, *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 5173 - 5178.
- [401] C. J. F. Böttcher, Theory of electric polarization. In Elsevier science publishers: Amsterdam, 1973; p 42.
- [402] H. Ephardt, P. Fromherz, *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 4540-4547.
- [403] V. Kharlanov, W. Rettig, *Chem. Phys.* **2007**, (332), 17-26.
- [404] D. B. Hall, S. O. Kelley, J. K. Barton, *Biochemistry* **1998**, 37, 15933-15940.
- [405] S. J. Atherton, P. C. Beaumont, *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 12025-12029.
- [406] A. I. Kononov, E. B. Moroshkina, N. V. Tkachenko, H. Lemmetyninen, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 535-541.
- [407] S. J. Atherton, P. C. Beaumont, *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 3993-3997.
- [408] D. A. Dunn, V. H. Lin, I. E. Kochevar, *Biochemistry* **1992**, 31, 11620-11625.
- [409] N. Amann. Synthese von Ethidium- und Pyren-modifizierten Oligonucleotiden und deren Einsatz bei der Untersuchung des Ladungstransfers durch die DNA. Dissertation, TU München, 2004.
- [410] G. Kokkinidis, A. Kelaidopoulou, *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 414, 197-208.
- [411] R. L. Letsinger, M. E. Schott, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 7394-7396.
- [412] W. R. Boon, *Outlook on Agriculture* **1964**, 4, 163-170.
- [413] A. Calderbank, *Biochem. J.* **1966**, 101, 2P-3P.
- [414] T. Seitz, M. G. Hoffmann, H. Krämer, *Chemie in unserer Zeit* **2003**, 37, 112-116.
- [415] J. Volke, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **1968**, 33, 3044-3048.
- [416] C. M. Bullivant, *Brit. Med. J.* **1966**, 5498, 1272-1273.
- [417] G. Bagetta, M. T. Corasaniti, M. Iannone, G. Nistico, J. D. Stephenson, *Pharmacol. Toxicol.* **1992**, 71, 443-448.
- [418] D. A. Cory-Slechta, M. Thiruchelvam, B. K. Barlow, E. K. Richfield, *Environmental Health Perspectives* **2005**, 113, 1263-1270.
- [419] L. Pospisil, J. Kuta, J. Volke, *Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1975**, 58, 217-219.
- [420] F. Aulenta, A. Catervi, M. Majone, S. Panero, P. Reale, S. Rossetti, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 2554-2559.
- [421] M. G. Almeida, C. M. Silveira, J. J. G. Moura, *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 22, 2485-2492.
- [422] M. E. Ghica, C. M. A. Brett, *Anal. Chim. Acta* **2005**, 532, 145-151.
- [423] J. H. Russell, S. C. Wallwork, *Acta Crystallographica Section B - Structural Crystallography and Crystal Chemistry* **1972**, B28, 1527-1530.
- [424] T. Ishida, M. Murakami, G. Watanabe, H. Yoshikawa, S.-I. Nishikiori, *Internet Electr. J. Mol. Des.* **2003**, 2, 14-23.
- [425] A. Calderbank, D. F. Charlton, J. A. Farrington, R. James, *J. Chem. Soc. - Perkin Trans. I* **1972**, 138-142.
- [426] E. Mayer-Enthart. Darstellung und Untersuchung von Modellsystemen für den Ladungstransfer in DNA und zwischen Peptiden und Oligonukleotiden. Dissertation, TU München, 2006.
- [427] S. T. Gaballah, T. L. Netzel, *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **2002**, 21, 681-694.
- [428] Y. Iso, F. Yoneda, H. Ikeda, K. Tanaka, K. Fuji, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 503-506.
- [429] H. Ikeda, K. Fuji, K. Tanaka, Y. Iso, F. Yoneda, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47, 1455 - 1463.
- [430] M. Meldal, C. W. Tornøe, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 2952-3015.
- [431] F. Amblard, V. Aucagne, P. Guenot, R. F. Schinazi, L. A. Agrofoglio, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 1239-1248.

- [432] L. A. Kelly, M. A. J. Rodgers, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 6386-6391.
- [433] I. Willner, N. Lapidot, A. Riklin, R. Kasher, E. Zahavy, E. Katz, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1428 - 1441.
- [434] C. L. Bird, A. T. Kuhn, *Chem. Soc. Rev.* **1981**, 10, 49 - 82.
- [435] S. Hunig, W. Schenk, *Liebigs Ann. Chem.* **1979**, 1523 - 1533.
- [436] D. Knittel, *Monatshefte Chem.* **1986**, 117, 679 - 687.
- [437] R. O. Lezna, S. A. Centeno, *Langmuir* **1996**, 12, 591 - 593.
- [438] E. A. Blubaugh, L. M. Doane, *Anal. Chem.* **1982**, 54, 329 - 331.
- [439] T. Watanabe, K. Honda, *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 2617-2619.
- [440] E. M. Kosower, J. L. Cotter, *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 5524 - 5527.
- [441] B. Beijer, M. Grotli, M. E. Douglas, B. S. Sproat, *Nucleosides and Nucleotides* **1994**, 13, 1905 - 1927.
- [442] M. Grotli, M. Douglas, B. Beijer, R. G. Garcia, R. Eritja, B. S. Sproat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1997**, 2779 - 2789.
- [443] W. T. Markiewicz, *J. Chem. Res.* **1979**, 24, 181.
- [444] M. Sekine, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2321- 2326.
- [445] N. Herzig. Postsynthetische Fluoreszenzmarkierung von Oligonukleotiden via Klick-Chemie. Diplomarbeit, Universität Regensburg, 2008.
- [446] W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.
- [447] V. V. Pavlishchuk, A. W. Addison, *Inorg. Chim. Acta* **2000**, 298, 97-102.
- [448] A. V. Azhayev, M. L. Antopolsky, *Tetrahedron* **2001**, 57, 4977-4986.
- [449] G. A. Crosby, J. N. Demas, *J. Phys. Chem.* **1971**, 75, 991-1024.
- [450] L. D. Jennifer L. Jamison, Brian W. Williams, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, 422, 30 - 35.
- [451] J. B. F. Christina M. Golini. Brian W. Williams, *J. Fluoresc.* **1998**, 8, 395 - 404.
- [452] J. D. Puglisi, J. Ignacio Tinoco, *Meth. Enzymol.* **1989**, 180, 304-325.
- [453] J. Pauluhn, A. Naujok, H. W. Zimmermann, *Z. Naturforsch.* **1980**, 35, 585-598.